



Universidade de Aveiro Departamento de Biologia  
2007

**Dora Susana Castro  
Rodrigues Augusto**

**Teores de vibrios halófilos patogénicos humanos em  
ostras, por NMP-PCR**



**Dora Susana Castro  
Rodrigues Augusto**

**Teores de vibrios halófilos patogénicos humanos em  
ostras, por NMP-PCR**

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Microbiologia, realizada sob a orientação científica do Dr. António Carlos Matias Correia, Professor associado com agregação do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro

## **o júri**

presidente

Prof. Doutor António Carlos Matias Correia, professor associado com agregação da Universidade de Aveiro

Prof. Doutora Ana Sofia Direito dos Santos Duarte, investigadora de pós-doutoramento da Universidade de Aveiro

Drª Sónia Cristina Nunes Salvador Correia Pedro, assistente de investigação no INRB/IPIMAR

## **agradecimentos**

Apoio financeiro no âmbito do III Quadro Comunitário de Apoio – MARE-FEDER - Projecto 22-05-01-FDR-00008 “Vigilância, segurança e qualidade alimentar”

Apoio financeiro no âmbito do III Quadro Comunitário de Apoio – MARIS - IFOP Projecto 44-03-13-IFP-0007 “Aplicação de critérios microbiológicos no controlo da qualidade de gastrópodes marinhos e moluscos bivalves vivos provenientes de ecossistemas alentejanos”.

## palavras-chave

*Vibrio vulnificus*, *Vibrio parahaemolyticus*, *tdh*, *trh*, NMP-PCR, APW-PCR, TCBS-PCR

## resumo

O presente estudo foi levado a cabo com o objectivo de determinar a ocorrência e os níveis de *Vibrio vulnificus*, *Vibrio parahaemolyticus* (total e potencialmente patogénico) em ostras naturalmente contaminadas, usando dois métodos diferentes de Número Mais Provável (NMP) em conjugação com a técnica de reacção em cadeia da polimerase (PCR) de modo a seleccionar o mais apropriado para análise de rotina. As ostras foram adquiridas em lojas e supermercados locais. Os valores de *V. vulnificus* (portador do gene que codifica a hemolisina/citolisina da bactéria - *vvhA*), *V. parahaemolyticus* total (portador do gene específico da espécie - *toxR*) e *V. parahaemolyticus* potencialmente patogénico (portador dos genes que codificam as hemolisinas directa termoestável - *tdh* e directa termoestável relacionada - *trh*) foram determinados usando dois métodos de NMP-PCR: (1) enriquecimento em água peptonada alcalina (APW) seguido de PCR (APW-PCR); e (2) enriquecimento em APW e isolamento em agar de tiosulfato citrato biliar sacarose (TCBS) seguido de confirmação das estirpes por PCR (TCBS-PCR). Foi detectado *V. vulnificus* em quatro amostras de ostras pelo método APW-PCR e em três amostras pelo método TCBS-PCR, mas nunca nas mesmas amostras. Foi possível encontrar *V. parahaemolyticus* em 14 amostras pelo método APW-PCR e em 13 amostras pelo método TCBS-PCR. Quanto aos factores de virulência, foi possível detectar o gene *tdh* em uma amostra somente pelo método APW-PCR; o gene *trh* foi detectado em cinco amostras por ambos os métodos, mas nem sempre na mesma amostra. O método APW-PCR demonstrou ser o mais adequado para detectar a presença de *V. parahaemolyticus* total em ostras, uma vez que gerou maior número de amostras positivas e detectou teores mais elevados, no entanto, recomenda-se o recurso a ambos os métodos para a detecção dos factores de virulência do *V. parahaemolyticus* e para a detecção de *V. vulnificus*.

**keywords**

*Vibrio vulnificus*, *Vibrio parahaemolyticus*, *tdh*, *trh*, NMP-PCR, APW-PCR, TCBS-PCR

**abstract**

The present study was carried out to determine the occurrence and levels of *Vibrio vulnificus* and total and potentially pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* bacteria in naturally contaminated oysters, using two Most Probable Number – Polymerase Chain Reaction (MPN-PCR) different methods in order to select the most appropriate for routine analysis. Oysters were collected from local stores and supermarkets. *V. vulnificus* (carrying the hemolysin/ cytotoxin *vvhA* gene), total *V. parahaemolyticus* (carrying the species-specific *toxR* gene) and potentially pathogenic (carrying the thermostable direct hemolysin - *tdh* and TDH-related hemolysin - *trh* genes) *V. parahaemolyticus* were enumerated by two MPN-PCR methods: (1) Alkaline Peptone Water (APW) enrichment followed by PCR (APW-PCR); and (2) APW enrichment plus isolation on Thiosulfate Citrate Bile Sucrose (TCBS) agar followed by PCR strain confirmation (TCBS-PCR). *V. vulnificus* was found in four oyster samples by the APW-PCR method and in three by the TCBS-PCR method, but never in the same samples. *V. parahaemolyticus* was found in 14 oyster samples by the APW-PCR method and in 13 by the TCBS-PCR method. Concerning virulence factors, *tdh* positive organisms were only detected by the APW-PCR method in one sample; *trh* positive organisms were found in five oyster samples by both methods though not always in the same sample. The APW-PCR method has shown to be more adequate for the detection of total *V. parahaemolyticus* in oysters, since it yielded a larger number of positive samples, however, for detection of *V. parahaemolyticus* virulence factors and *V. vulnificus*, both methods should be used.

## Índice

Objectivos.....	1
Introdução .....	3
As ostras.....	4
Características das espécies de <i>Vibrio</i> .....	5
<i>V. parahaemolyticus</i> - Reservatórios .....	6
<i>V. parahaemolyticus</i> - Surtos de intoxicação alimentar .....	6
<i>V. parahaemolyticus</i> - Características da doença.....	8
<i>V. parahaemolyticus</i> - Mecanismos de virulência .....	8
<i>V. vulnificus</i> .....	10
<i>V. vulnificus</i> - Reservatórios .....	11
<i>V. vulnificus</i> - Surtos de intoxicação alimentar.....	12
<i>V. vulnificus</i> - Características da doença .....	13
<i>V. vulnificus</i> - Mecanismos de virulência .....	15
Número Mais Provável (NMP) .....	16
Reacção em cadeia da polimerase (“PCR”) .....	17
Materiais e Métodos .....	19
Ostras .....	20
Estirpes de controlo .....	20
TCBS .....	20
PCR .....	20
Preparação e enriquecimento das amostras .....	21
Método APW-PCR.....	21
Extracção de DNA a partir de caldo de enriquecimento (APW) .....	21
Método TCBS-PCR .....	21
Isolamento das colónias.....	21
Extracção de DNA de colónias provenientes de TCBS.....	22
Reacção em cadeia da polimerase – “PCR” .....	22
“Primers” .....	22
Amplificação por “PCR” dos vários genes em estudo .....	23
Visualização dos produtos de amplificação.....	24

Determinação do NMP e tratamento de resultados .....	25
Resultados e Discussão .....	26
Detecção de <i>V. vulnificus</i> .....	27
Detecção de <i>V. parahaemolyticus</i> .....	27
Teores e sazonalidade dos <i>Vibrio</i> halófilos.....	29
Conclusão .....	37
Anexo 1 .....	40
Tabelas de dados .....	40
Anexo 2 .....	45
Meios de cultura e reagentes preparados por componentes .....	45
Bibliografia.....	47

## Índice de Tabelas

Tabela 1 – Sequências dos “primers” e respectivas fontes.....	23
Tabela 2 – Condições de “PCR” utilizadas.....	24
Tabela A - Valores de NMP/g ostra obtidos pelo método APW-PCR.....	41
Tabela B - Valores de NMP/g ostra obtidos pelo método TCBS-PCR .....	43

## Índice de Figuras

Figura 1 - Gel de agarose dos produtos de “PCR” para detecção de <i>V. vulnificus</i> .....	27
Figura 2 - Gel de agarose dos produtos de “PCR” para detecção do gene <i>toxR</i> de <i>V. parahaemolyticus</i> .....	28
Figura 3 - Gel de agarose dos produtos de “PCR” (multiplex) para detecção dos genes <i>tdh</i> e <i>trh</i> de <i>V. parahaemolyticus</i> .....	29
Figura 4 – Representação gráfica dos teores de <i>V. parahaemolyticus</i> e <i>V. vulnificus</i> detectados pelos método APW-PCR e TCBS-PCR.....	30
Figura 5 – Representação gráfica dos teores de <i>V. vulnificus</i> (log (NMP)/g ostra) determinados por detecção do gene <i>vvhA</i> . .....	30



Figura 6 – Representação gráfica dos teores de <i>V. parahaemolyticus</i> total (log (NMP)/g ostra) determinados por detecção do gene <i>toxR</i> . ....	32
Figura 7 – Representação gráfica dos teores de <i>V. parahaemolyticus</i> (log (NMP)/g ostra) potencialmente patogénico, portador do gene <i>tdh</i> .....	33
Figura 8 – Representação gráfica dos teores de <i>V. parahaemolyticus</i> (log (NMP)/g ostra) potencialmente patogénico, portador do gene <i>trh</i> .....	34
Figura 9 – Detecção de <i>V. parahaemolyticus</i> total pelo método APW-PCR ....	35
Figura 10 – Detecção de <i>V. parahaemolyticus</i> total pelo método TCBS-PCR .	35
Figura 11 – Detecção de teores superiores a 100 NMP/g de <i>V. parahaemolyticus</i> total pelo método APW-PCR .....	35
Figura 12 – Detecção de teores superiores a 100 NMP/g de <i>V. parahaemolyticus</i> total pelo método TCBS-PCR.....	35

## Objetivos

A problemática da segurança alimentar é um tema que tem emergido nos últimos anos, constituindo na actualidade, um dos maiores desafios que o sector alimentar tem de enfrentar. Uma das vertentes mais relevantes é a contaminação microbiana dos géneros alimentícios, uma vez que os perigos microbiológicos representam uma das principais causas de doenças transmitidas pelos alimentos que afectam o Homem.

De entre os microrganismos patogénicos presentes na água do mar, os indígenas, como é o caso dos *Vibrio* halófilos, são aqueles que podem apresentar uma maior probabilidade de ocorrência, representando um potencial risco para os consumidores de produtos da pesca.

Apesar do *Vibrio parahaemolyticus* não constar dos Regulamentos da UE relativos aos critérios microbiológicos dos géneros alimentícios, tem estado associado a surtos devido ao consumo de bivalves, sendo de elevada relevância a aplicação de técnicas rápidas, mas sensíveis e específicas, que possibilitem a recuperação de células danificadas, muitas vezes viáveis mas não cultiváveis, assim como a sua identificação. Assim, é da maior importância estudar métodos para determinar o teor de *Vibrio vulnificus* e *V. parahaemolyticus* em bivalves, que apresentem uma sensibilidade e especificidade adequada a esta matriz e que sejam pouco dispendiosos e facilmente aplicáveis a grande volume de amostras, de modo a possibilitar a sua implementação no âmbito da garantia da qualidade das empresas do sector dos produtos da pesca e aquicultura.

Neste contexto, a utilização de um método de quantificação deste organismo usando a técnica do número mais provável (NMP), associada à detecção por reacção de polimerase em cadeia (PCR) ou seguida de isolamento em meio selectivo e identificação por PCR parece ser uma alternativa interessante às metodologias clássicas. Assim, o presente trabalho tem como principal objectivo comparar dois métodos que permitem estimar os níveis de contaminação por *Vibrio vulnificus* e *Vibrio parahaemolyticus* (teor total e potencialmente patogénico) recorrendo aos métodos APW-PCR e TCBS-PCR.

Pretende-se ainda estimar os níveis de contaminação por estes microrganismos em moluscos bivalves vivos habitualmente consumidos crus, nomeadamente ostras, contribuindo para a realização de recomendações ao

consumidor e disponibilizando informação que pode ser relevante para uma futura análise de risco.

Este trabalho foi realizado no laboratório de microbiologia do departamento de inovação tecnológica e valorização dos produtos da pesca (DITVPP), do IPIMAR, unidade orgânica do Instituto Nacional de Recursos Biológicos (INRB).

O trabalho encontra-se estruturado em três capítulos, a seguir indicados, para além dos presentes "Objectivos" e da "Conclusão" :

Capítulo 1 – Introdução. Este capítulo procura abranger temas como a caracterização dos bivalves em estudo (as ostras) e a sua susceptibilidade a contaminações microbiológicas, mas também, a caracterização das bactérias em estudo incluindo as características culturais e bioquímicas, as exigências nutricionais, a sua ocorrência e os métodos de detecção, quantificação e identificação;

Capítulo 2 – Materiais e métodos. Neste capítulo são descritos os materiais, métodos e amostras de estudo;

Capítulo 3 – Resultados e discussão. Neste capítulo são apresentados os resultados obtidos nos diversos ensaios realizados, bem como a discussão dos mesmos com base em literatura diversa.

Na "Conclusão" é apresentada a avaliação dos métodos e outros aspectos importantes do estudo realizado. Por fim são apresentados dois anexos com os valores do NMP obtidos e a composição de reagentes e meios de cultura preparados por componentes, assim como as referências bibliográficas.

## **Introdução**

## As ostras

A crença de que a ingestão de ostras, especialmente cruas, aumenta a libido é já de longa data. Será que existe algum facto que apoie a ficção? As ostras podem ter ganho a sua reputação numa altura em que as dietas eram nutricionalmente deficientes e o seu contributo em vitaminas e minerais era importante e conduzia a uma melhoria da saúde em geral (incluindo o apetite sexual). De facto, as ostras contêm dopamina, um neurotransmissor que ajuda a regular a actividade cerebral e influencia o desejo sexual em homens e mulheres (FOC, 2007). As paixões provocadas pelo consumo de ostras podem também estar relacionadas com os elevados níveis de zinco, açúcares e proteínas complexos (FOC, 2007). Como todos os bivalves, as ostras contêm uma grande variedade de vitaminas, minerais e ácidos gordos o que as torna um bom contributo para uma dieta equilibrada. (FOC, 2007)

As ostras são habitualmente consumidas cruas, ou levemente cozinhadas, no entanto, as pessoas raramente se apercebem ou têm em consideração os riscos associados ao consumo de moluscos bivalves crus ou mal cozinhados. As espécies de ostra *Crassostrea gigas* e *C. angulata* contam-se entre os bivalves mais consumidos a nível mundial. De acordo com o Interstate Shellfish Sanitation Conference (ISSC, 1998) a qualidade das ostras pode ser avaliada de várias formas: quando se bate na concha das ostras, esta deve fechar rapidamente; se a concha não ficar bem fechada ou se encontrar seca quando se abre, não deve ser consumida. Além disso, se a concha estiver partida ou danificada não se recomenda o seu consumo. Por último, a parte edível das ostras deve apresentar cor creme e cheiro a maresia.

Como afirma Jørgensen (1996), as ostras, tal como os outros moluscos bivalves, alimentam-se por filtração capturando as partículas alimentares em suspensão no oceano. Desta forma são também capazes de reter as bactérias presentes na água, o que as torna um bom veículo de transporte de bactérias patogénicas para o Homem (especialmente membros da família *Vibrionaceae*, como sejam o *Vibrio parahaemolyticus* ou *V. vulnificus*). Aproveitando o fluxo

criado pelas ostras com o intuito de se alimentarem, as bactérias alojam-se na hemolinfa, guelras, músculo adutor e manto (Tamplin e Capers, 1992). A contaminação das ostras com bactérias patogénicas pode ter um impacto económico negativo na indústria e comércio das ostras, pois as bactérias patogénicas podem pôr em risco a segurança dos consumidores podendo originar doenças graves, senão mesmo a morte no caso de indivíduos mais susceptíveis.

## **Características das espécies de *Vibrio***

De acordo com Thompson e co-autores (2004), os membros da família *Vibrionaceae* caracterizam-se por serem bastonetes Gram negativos, geralmente móveis, mesofílicos e quimiorganotróficos, anaeróbios facultativos, de um modo geral halofílicos e podem ser encontrados em ambientes aquáticos em associação com eucariotas. O número de espécies que compõem o género *Vibrio* passou de 20 em 1981 para 47 em 2002 e, actualmente já conta com 81 espécies diferentes (Euzéby, 2007). Pelo menos 13 espécies são passíveis de causar infecções em humanos apesar de a maioria ser causada por *V. cholerae*, *V. parahaemolyticus* ou *V. vulnificus*, (FAO/WHO, 2001). Das 13 espécies, 8 estão directamente associadas ao consumo de alimentos. Uma das formas mais comuns de infecções por *Vibrio*, resulta do consumo de produtos de origem marinha. Os vibrios são o género bacteriano predominante nas águas estuarinas e estão associados a uma grande variedade de moluscos (como as amêijoas, mexilhões e ostras (Oliver *et al.*, 1983; DePaola *et al.*, 1994; Wright *et al.*, 1996, Pedro *et al.*, 2005), corais, peixes, camarões e zooplâncton (Thompson *et al.*, 2004). Aproximadamente 40 a 60% do pescado e bivalves que encontramos à venda nos estabelecimentos comerciais pode conter *Vibrio* spp. As espécies isoladas com maior frequência são *V. parahaemolyticus* e *V. alginolyticus*. O número de vibrios nas águas superficiais e nos bivalves é sazonal e, normalmente, mais elevado de Abril a Outubro, meses em que a temperatura se encontra mais elevada. Esta sazonalidade é mais evidente para as infecções por *V. vulnificus* e *V. parahaemolyticus* do que para outros vibrios como o *V. fluvialis* que ocorrem ao longo de todo o ano. (Montville e Matthews 2005)

## ***V. parahaemolyticus* - Reservatórios**

O *V. parahaemolyticus* ocorre naturalmente em águas estuarinas por todo o mundo e pode ser facilmente isolado em águas costeiras, sedimentos, partículas em suspensão, plâncton e numa enorme variedade de peixes e moluscos. Esta última fonte inclui, pelo menos, 30 espécies diferentes entre as quais amêijoas, ostras, lagostas, vieiras, camarões e caranguejos. (Montville e Matthews, 2005) Durante o Verão, os bivalves apresentam muitas vezes níveis de *V. parahaemolyticus* 10 a 100 vezes superiores aos apresentados pelas águas adjacentes. Sob a acção de condições ambientais desfavoráveis, esta bactéria pode entrar numa fase de viabilidade precária (células viáveis, mas não cultiváveis), da qual apenas recuperam em meio de enriquecimento (CFSAN, 2000). Apesar de entrarem neste estado precário, a sua virulência apenas parece ser retardada ou diminuída (Wong *et al.*, 2004). A sua presença não resulta da poluição e, por isso, esta não pode ser estimada por valores de contaminação fecal usados para monitorizar a qualidade da água em zonas de colheita de ostras. Os vibrios concentram-se nas brânquias das ostras e outros moluscos que se alimentam por filtração, onde aderem e se multiplicam, tornando-se resistentes à depuração. Deste modo, a sua presença no meio ambiente representa um risco de transmissão a organismos superiores incluindo o homem (Hlady, 1997, Arias *et al.*, 1999).

## ***V. parahaemolyticus* - Surto de intoxicação alimentar**

Juntamente com o *V. cholerae*, o *V. parahaemolyticus* é um dos vibrios patogénicos mais estudados. Existem inúmeros estudos realizados desde o primeiro relato do seu envolvimento num surto de intoxicação alimentar em 1950. As gastroenterites provocadas por *V. parahaemolyticus* estão quase exclusivamente associadas ao consumo de moluscos crus, inadequadamente cozinhados ou cozinhados, mas recontaminados. Nos Estados Unidos, entre 1973 e 1998 foram detectados e comunicados aos Centers for Disease Control and



Prevention (CDC) 40 surtos de *V. parahaemolyticus* envolvendo um total de mais de 1000 pessoas. (Montville e Matthews, 2005). No Japão, esta bactéria é a principal causa de intoxicações alimentares. Aproximadamente 70% de todas as intoxicações alimentares verificadas nos anos 60 foram causadas por *V. parahaemolyticus*. Nos Estados Unidos, o primeiro grande surto (envolvendo 320 pessoas) ocorreu em 1971 como resultado do consumo de caranguejos mal cozinhados. Vários surtos ocorreram desde então ao longo das regiões costeiras dos Estados Unidos e Hawaii, tendo o maior surto de infecção por *V. parahaemolyticus* ocorrido durante o Verão de 1978 e afectado 1133 pessoas das 1700 que se encontravam presentes num jantar em Port Allen, LA. (Montville e Matthews, 2005). Durante a década de 70 ocorreram vários casos de toxinfecções alimentares por *V. parahaemolyticus* na Índia, Indonésia, Tailândia, Vietnam, Coreia e Japão (Blake *et al.*, 1980). Em 1982, ocorreram dois outros surtos nos Estados Unidos que envolveram 219 pessoas, incluindo uma morte (Panicker *et al.*, 2004). Durante o Verão de 1998 ocorreu o primeiro surto em que se confirmou a presença de *V. parahaemolyticus* em ostras cruas provenientes da Baía de Galveston (USA). Este surto durou de Maio a Julho de 1998 e o que o torna digno de nota é o facto de a bactéria envolvida ter sido anteriormente identificada em 1995 na Índia (DePaola *et al.*, 2000). Também recentemente foram relatados vários surtos relacionados com vibrios em países europeus, como a Espanha (Su e Liu, 2007), Dinamarca (Hoi *et al.*, 1998), Itália (Ripabelli *et al.*, 1999) e França (Su e Liu, 2007). Mesmo em Portugal, em Setembro de 2004, cerca de 50 pessoas recorreram ao Serviço de Urgência do Hospital de Aveiro com sintomas de intoxicação alimentar provocada por mariscos (Costa, 2007), no entanto, não existem provas de que o agente etiológico tenha sido um *Vibrio*. A empresa Adviware Pty Lda (2007) no seu site estima que em Portugal existem cerca de 26 casos anuais de toxinfecções por *V. parahaemolyticus*. Contudo, estes valores são apenas extrapolações e não existem registos médicos ou científicos que possam validar estas estimativas.

## ***V. parahaemolyticus* - Características da doença**

O *V. parahaemolyticus* tem tempos de duplicação de oito a nove minutos e de 12 a 18 minutos a 37°C nos moluscos. Deste modo podemos verificar que esta bactéria tem a capacidade de crescer rapidamente, tanto *in vitro* como *in vivo*, o que torna fácil atingir a dose infecciosa. Os primeiros sintomas podem aparecer de 4 a mais de 30 horas após a ingestão de alimentos contaminados, mas o tempo médio de incubação é de 23,6 horas. A gastroenterite causada por *V. parahaemolyticus* é, em geral, uma doença auto-limitante, de gravidade moderada e de curta duração. Porém, há registo de casos graves com necessidade de hospitalização. Os sintomas associados a uma infecção por *V. parahaemolyticus* incluem diarreia intensa, náuseas, vômitos, dores abdominais e, com menos frequência, dores de cabeça, febre e arrepios. Em raras ocasiões pode ocorrer septicémia (infecção generalizada que se caracteriza por febre e hipotensão) e isolamento do microrganismo no sangue. Nestes casos, os sintomas subsequentes podem incluir inchaço e dores nas extremidades. A doença pode durar entre 2 horas e 10 dias (CFSAN, 2000) e ocorre quando a bactéria adere ao intestino delgado do paciente. Para provocar doença são necessárias entre  $10^5$  e  $10^7$  UFC, mas este valor pode ser reduzido pelo consumo de antiácidos ou alimentos com capacidade tampão (CFSAN, 2006). Os números de *V. parahaemolyticus* presentes no pescado e moluscos são geralmente inferiores a  $10^4$  UFC Kanagawa positivas (células que apresentam actividade hemolítica em agar de Wagatsuma) o que sugere falta de cuidado na manutenção da temperatura de refrigeração antes do consumo pois o aumento da temperatura permite que a bactéria se desenvolva e atinja valores que provocam doenças. (Montville e Matthews, 2005)

## ***V. parahaemolyticus* - Mecanismos de virulência**

Algumas das estirpes de *V. parahaemolyticus* podem provocar gastroenterites no Homem após consumo de produtos marinhos contaminados. Estudos epidemiológicos moleculares revelaram uma forte correlação entre a

existência dos genes que codificam duas hemolisinas (*tdh*, *trh* ou ambas) e a capacidade de provocar doenças, o que vem demonstrar que estes genes são importantes factores de virulência. No entanto, uma pequena porção das estirpes clínicas não apresenta nenhum dos genes referidos, o que torna necessário isolar a bactéria que se suspeita ser responsável pela doença e proceder a testes bioquímicos afim de a identificar (Lin *et al.*, 1993). De acordo com Deepanjali e co-autores (2005) cerca de 90% dos isolados clínicos produzem hemolisina directa termoestável (TDH), contudo apenas 1% dos isolados ambientais produzem esta enterotoxina. Além disso, as estirpes clínicas exibem actividade hemolítica em agar de Wagatsuma, enquanto as estirpes ambientais não o fazem. Esta actividade hemolítica, denominada fenómeno de Kanagawa (KP), tem sido usada como marcador de virulência do *V. parahaemolyticus*. O KP é causado pela TDH produzida por este organismo. Além da actividade hemolítica, a TDH já demonstrou ter várias outras actividades biológicas, tais como a enterotoxigenicidade, citotoxicidade, cardiotoxicidade, letalidade em pequenos animais e capacidade de estimular a permeabilidade vascular. O gene (*tdh*) que codifica a TDH foi detectado em todas as estirpes KP positivas. O nível de produção de TDH está relacionado com as condições culturais e um meio de cultura com pH baixo estimula a sua produção (Lin *et al.*, 1993). Um outro factor de virulência, a hemolisina directa termoestável relacionada (TRH), encontra-se também associado às estirpes KP negativas ou urease positivas. As estirpes KP negativas também se encontram envolvidas em alguns surtos de intoxicação alimentar e, esporadicamente, em casos de feridas infectadas. É de salientar que as estirpes de *V. parahaemolyticus* isoladas a partir de produtos do mar são geneticamente muito heterogêneas e as KP positivas ocorrem em proporções extremamente baixas (Wong, 2003). Apesar de já se saber bastante acerca das toxinas do *V. parahaemolyticus*, pouco se sabe ainda sobre o processo de aderência. Este é um passo essencial na patogénese da maioria dos enteropatogénicos (agentes patogénicos que infectam os intestinos). Vários autores propuseram como factores de adesão a membrana exterior, os flagelos laterais, os pili (importantes na adesão e colonização das superfícies do hospedeiro) ou uma hemaglutinina associada à célula. No entanto, a importância

destes factores na doença humana é ainda desconhecida. (Montville e Matthews, 2005) Além das propriedades de aderência existem ainda factores relacionados com a superfície celular que regulam a resistência à lise e outras defesas naturais do hospedeiro (Janda *et al.*, 1988).

Em 1999, Kim e co-autores criaram e testaram um protocolo de PCR para a identificação de *V. parahaemolyticus* (independentemente de possuir ou não factores de patogénese) baseado na detecção do gene *toxR*. Este gene é específico da espécie e tem como função a estimulação de genes responsáveis pela produção de enterotoxinas (Lin *et al.*, 1993).

Recentemente, foi relatada a presença de um novo sideróforo (vibrioferina - sistema de aquisição de ferro a partir do hospedeiro, que facilita o crescimento da bactéria) no *V. parahaemolyticus*, capaz de remover ferro da transferrina humana. No entanto, a sua importância para a patogénese não está, ainda, estabelecida (Comissão Europeia, 2001).

## ***V. vulnificus***

O *V. vulnificus* foi pela primeira vez descrito por Reichelt e co-autores (1976) como *Beneckea vulnifica* (Tyson e Kelly, 1986). Ainda no ano de 1976, Hollis e co-autores caracterizaram e colocaram no banco de estirpes ATCC, duas estirpes de *Vibrio* lactose positivas às quais foi mais tarde atribuído o nome *Vibrio vulnificus* (Hollis *et al.*, 1976). Trata-se de uma bactéria móvel, Gram-negativa, com forma de bacilo encurvado com um único flagelo polar. Distingue-se dos outros membros do género *Vibrio* pela sua capacidade de fermentar a lactose. A sua presença nos ambientes estuarinos não se deve a poluição ou outras formas de contaminação. Sob certas condições, esta bactéria tem a capacidade de causar infecções graves e muitas vezes fatais. Estas incluem septicemia invasiva, geralmente contraída pelo consumo de moluscos bivalves crus ou pouco cozinhados, bem como infecção de feridas, adquirida pelo contacto com água do mar ou bivalves onde o organismo esteja presente. (Strom e Paranjpye, 2000)

O *V. vulnificus* é o mais problemático dos vibrios patogénicos, nos Estados Unidos. Esta bactéria é responsável por 95% das mortes por intoxicação

alimentar neste país. Os casos de septicemia primária, em pessoas com susceptibilidade a infecções por esta bactéria, resultantes do consumo de ostras cruas têm taxas de mortalidade de 60%. Nos Estados Unidos, o *V. vulnificus* é a bactéria que apresenta uma taxa de mortalidade por consumo de alimentos mais elevada. Os Centers for Disease Control and Prevention (CDC) estimam a existência de cerca de 50 casos de intoxicações alimentares com *V. vulnificus* por ano. Quando ocorre infecção de feridas é muitas vezes necessário recorrer a operações para limpar os tecidos infectados chegando mesmo, em alguns casos, a ser necessário amputar o membro afectado. (Montville e Matthews 2005)

## ***V. vulnificus* - Reservatórios**

Esta bactéria é um habitante natural de ambientes estuarinos e marinhos da costa do Golfo, Atlântico e Pacífico, dos Estados Unidos e outros locais por todo o mundo. A temperatura da água influencia a presença e os níveis deste agente patogénico. É uma bactéria que prefere climas tropicais a sub-tropicais e já foi isolada em águas com temperaturas entre os 9 e os 31°C. Prolifera em zonas onde a temperatura da água excede os 18°C ou durante os meses em que se verificam estas mesmas condições. Raramente é isolado a partir de água ou ostras quando as temperaturas da água são baixas. Inicialmente pensava-se que este facto resultava da morte induzida pela baixa temperatura, durante os meses de frio. No entanto, hoje em dia pensa-se que pode estar relacionado com a capacidade destas bactérias entrarem num estado Viável Mas Não Cultivável (tal como o *V. parahaemolyticus*) (Montville e Matthews, 2005). Salinidades baixas a moderadas também estão associadas à presença desta bactéria. Apesar de já ter sido isolado em águas com um teor de sal entre 0,8 partes por milhão (ppm) e 35 ppm, a gama habitual varia entre os 5 e os 25 ppm (Harwood *et al.*, 2004; WHO, 2005). O *V. vulnificus* pode ser encontrado isolado ou em associação com sedimentos, areia, peixe, bivalves, zooplâncton (Oliver *et al.*, 1983; DePaola *et al.*, 1994) ou outra flora aquática. Esta bactéria é acumulada pelos moluscos que se alimentam por filtração como as ostras, amêijoas, mexilhões e vieiras. Durante os meses em que a temperatura da água se encontra mais elevada, as

concentrações podem atingir valores entre  $1 \times 10^3$  e  $1 \times 10^6$  UFC por grama de ostra. (Strom e Paranjpye, 2000) Num estudo conduzido por Arias e co-autores (1999) sobre a prevalência de vibrios em água do mar e moluscos bivalves da costa espanhola do Mar Mediterrâneo, foi detectado um baixo número desta bactéria. De acordo com os autores, este facto pode ser explicado pela elevada salinidade que esta zona apresenta. Num outro estudo levado a cabo por Barbieri *et al.* (1999) foi examinada a ocorrência de vibrios em águas estuarinas ao longo da costa italiana do Mar Adriático. De um total de 103 estirpes de *Vibrio*, apenas 2 revelaram ser *V. vulnificus*, o que demonstra uma baixa prevalência. Num grande estudo realizado por Oliver e co-autores (1983), foi estudada a presença de *V. vulnificus* em 80 locais ao longo da costa este dos Estados Unidos. De acordo com os autores deste estudo, a água do mar analisada apresentava em média 7 UFC de *V. vulnificus* por mL e as ostras apresentavam em média  $6 \times 10^4$  UFC/g. Outras publicações indicam que o número de bactérias desta espécie presente nas ostras excede o da água do mar em que estas são colhidas num factor de 100. (Comissão Europeia, 2001) Nas ostras, o *V. vulnificus* resiste à depuração e outros métodos químicos de desinfecção habitualmente usados para eliminar os agentes patogénicos entéricos. Actualmente, o único método eficiente para destruir esta bactéria consiste em cozinhar muito bem os moluscos bivalves. (Strom e Paranjpye, 2000)

## ***V. vulnificus* - Surto de intoxicação alimentar**

De um modo geral, esta bactéria não se encontra implicada em surtos de intoxicação alimentar. Ao invés disso, envolve casos isolados devidos ao consumo de ostras cruas. Não existem registos de mais do que uma pessoa que tenha desenvolvido infecções por *V. vulnificus* após consumo de um mesmo lote de ostras. As ostras cruas do mesmo lote, ou do mesmo prato, podem ter níveis muito diferentes de contaminação. De facto, duas ostras retiradas do mesmo local podem ter populações muito diferentes de *V. vulnificus* (Montville e Matthews, 2005). Um estudo demonstrou que em três casos separados, os pacientes faleceram após dois a três dias após o consumo de ostras cruas (Calero, 2003),

enfatizando a natureza virulenta e ameaçadora deste organismo. É de salientar que as toxinfecções alimentares por *V. vulnificus* estão claramente associadas a problemas clínicos do paciente (WHO, 2005). Os relatórios examinados pelo CDC revelam que cerca de 50% dos casos estudados estavam relacionados com o consumo de ostras cruas, 40% com feridas infectadas e 10% eram de origem desconhecida. (Calero, 2003)

Na maioria dos casos, as doenças por *V. vulnificus* ocorrem nos meses de Abril até Outubro, quando a temperatura da água é mais elevada e quase todos resultam em septicemia primária. (Montville e Matthews, 2005)

## ***V. vulnificus* - Características da doença**

As infecções humanas por *V. vulnificus* ocorrem em locais onde seja possível isolar a bactéria. Um exame atento das condições ambientais, dos factores do hospedeiro e dos factores de virulência bacterianos originou um melhor conhecimento do modo como são adquiridas as infecções por *V. vulnificus*. Uma vez que os vibrios proliferam em águas quentes, a maior parte das infecções acontece durante os meses mais quentes do ano (Strom e Paranjpye, 2000).

Esta bactéria é responsável por vários tipos de doenças: septicemia primária, infecção de feridas e gastroenterites. Boa parte dos casos de septicemia primária e gastroenterites envolve o consumo de ostras cruas. As infecções de feridas estão normalmente relacionadas com o contacto directo com águas ou moluscos bivalves em locais ou durante épocas do ano em que os valores de *V. vulnificus* são elevados. Estudos anteriores demonstraram que mesmo um único microrganismo é suficiente para causar doença em modelos animais com excesso de ferro (Calero, 2003), mas desconhece-se qual a dose infecciosa ou letal desta bactéria para os humanos. No entanto, sabe-se que a susceptibilidade do hospedeiro é um factor crucial. As pessoas que são mais susceptíveis a infecções por *V. vulnificus* são homens com mais de 50 anos (Calero, 2003) com doenças crónicas que lhes afectam o fígado ou o sistema imunitário. As doenças de fígado incluem cirrose ou outras doenças resultantes do consumo de álcool, hepatite ou

historial de hepatite, cancro metastático ou transplante de fígado. Também incluídos estão problemas hematológicos que resultem em elevados teores de ferro como é o caso da talassémia e da hemocromatose. Outros factores que predis põem as pessoas a infecções por *V. vulnificus*, incluem sistemas imunitários naturalmente comprometidos (SIDA) ou terapêuticamente induzidos (como é o caso da quimioterapia), outras doenças intestinais crónicas (diabetes melitus, doenças renais, doenças intestinais crónicas ou dependência de esteróides), ou suco gástrico pouco ácido (natural ou terapêuticamente induzido). No entanto, mesmo com todos os indicadores de susceptibilidade do hospedeiro, é importante salientar que é invulgar contrair uma infecção provocada por *V. vulnificus* (Strom e Paranjpye, 2000).

As infecções são adquiridas após consumo de produtos marinhos contaminados, crus ou pouco cozinhados (Fischer-Le Saux *et al.*, 2002) ou após contacto de feridas com água do mar/ produtos do mar (Campbell *et al.*, 2003). Os sintomas e a gravidade da doença em pessoas infectadas com *V. vulnificus* dependem do tipo de infecção: os pacientes com septicemia primária habitualmente apresentam febre súbita, arrepios muitas vezes acompanhados por vômitos, diarreia, dores abdominais e das extremidades. Durante as primeiras 24 horas após o aparecimento da doença, vários pacientes começam a desenvolver lesões cutâneas secundárias nas extremidades. Muitas vezes estas lesões evoluem para necrose dos tecidos e requerem amputação cirúrgica. A septicemia primária é fatal em 60 a 75% dos pacientes (Strom e Paranjpye, 2000). Os pacientes que sofrem de infecção de feridas por *V. vulnificus* apresentam sintomas semelhantes aos de uma septicemia primária mas diferem no tempo de aparecimento e na gravidade. Habitualmente, surge inflamação no local da ferida da qual pode ser isolada a bactéria. Estas infecções podem evoluir para necrose dos tecidos, tal como acontece com uma septicemia primária. As infecções de feridas provocadas por *V. vulnificus* são fatais em cerca de 20 a 30% dos casos. Nos casos em que ocorre gastroenterite provocada por *V. vulnificus* e há necessidade de hospitalização, os sintomas incluem febre, diarreia, dores abdominais, náuseas e vômitos. No entanto, a maioria dos casos é auto-limitante e não existe necessidade de hospitalização. (Strom e Paranjpye, 2000)



De acordo com a Comissão Europeia (2001), em 1999, Evans afirmava que as infecções por *V. vulnificus* eram responsáveis por aproximadamente 90% de todas as mortes relacionadas com o consumo de produtos marinhos nos EUA. Uma rápida detecção dos sintomas clínicos é crucial para o tratamento adequado das infecções de feridas e de sangue (Calero, 2003).

## ***V. vulnificus* - Mecanismos de virulência**

Muitos estudos já foram realizados afim de caracterizar os mecanismos utilizados pela bactéria *V. vulnificus* para causar septicemias fulminantes e infectar feridas. Estudos de Nilsson e co-autores (2003) demonstraram que apenas algumas estirpes das diversas populações de *V. vulnificus* encontradas em ostras estão associadas a doenças humanas. No entanto, não existe ainda disponível um teste definitivo para medir a virulência, nem dados disponíveis para determinar a sua sazonalidade e a Dose Letal humana permanece desconhecida. Os mecanismos de virulência associados ao *V. vulnificus* incluem uma cápsula polissacarídica (CPS), uma citolisina, uma protease/elastase e uma fosfolipase que podem ser encontradas em quase todas as estirpes clínicas e ambientais. (WHO, 2005)

Até 2000, apenas tinha sido demonstrada uma relação directa entre a posse de uma cápsula polissacarídica (CPS) que envolve a bactéria e a sua virulência. No entanto, apesar de a CPS ser essencial para a virulência, este não é o único factor a ter em conta, pois a virulência é multifactorial. Os isolados encapsulados possuem colónias com uma morfologia opaca, mas podem sofrer uma transformação reversível no fenótipo translúcido que está relacionado com uma baixa expressão da CPS. De acordo com Thompson e co-autores (2004), Smith e Siebeling descreveram 4 genes responsáveis pela síntese da CPS. Mutações em qualquer dos genes que afecta a biossíntese ou transporte da CPS, resulta numa diminuição mensurável da virulência. Vários estudos demonstraram que a cápsula protege a bactéria conferindo-lhe resistência contra os efeitos bactericidas do soro e contra a fagocitose pelos macrófagos. Vários outros factores contribuem para a patogénese desta bactéria, como a LPS (um importante mediador de choque

séptico (Calero, 2003)), os pili, várias enzimas e toxinas degradativas (permitem uma rápida invasão e uma extensa destruição dos tecidos do hospedeiro) e os sideróforos (capazes de adquirir ferro a partir da transferrina e lactoferrina do hospedeiro (Calero, 2003)).

## **Número Mais Provável (NMP)**

O método do Número Mais Provável (NMP), como descrito pela US Food and Drug Administration no seu Bacteriological Analytical Manual (FDA, 2006) é habitualmente usado para detecção de *V. parahaemolyticus* em alimentos. Este método baseia-se na inoculação de diluições decimais de uma amostra em várias séries de tubos. Cada diluição (podendo conter microrganismos viáveis ou não) é inoculada em três ou cinco tubos de meio de enriquecimento. Os tubos são considerados positivos se apresentarem colónias características em Thiosulfate Citrate Bile Sucrose (TCBS) agar, devidamente confirmadas com testes bioquímicos (galerias API 20E ou API 20 NE) ou imunológicos. Por fim, são usadas tabelas de NMP para saber qual a concentração estimada para a combinação de tubos positivos (devidamente confirmados) encontrada. Os valores de NMP são habitualmente calculados com base em três diluições decimais com 0,1g, 0,01g e 0,001g de inóculo, distribuídas em séries de três ou cinco tubos. Estes resultados apenas fornecem uma estimativa da concentração inicial de bactérias presentes na amostra, mas não fornecem uma contagem directa das mesmas.

Este método é particularmente útil para baixas concentrações de microrganismos (<100/g), mas apenas permite quantificar organismos viáveis (FDA, 2006).

Apesar de ser muito útil, este método é muito laborioso e requer grandes quantidades de tubos com meio de enriquecimento e placas de agar. Além disso, muitas vezes é difícil distinguir as colónias de *V. parahaemolyticus* de algumas colónias de *V. vulnificus* ou *V. mimicus* em TCBS, uma vez que estas formam colónias idênticas (colónias verdes ou verde-azuladas, com 2 a 3 mm de diâmetro) (Su e Liu, 2007). Assim, é habitual proceder à identificação de várias

colónias presumivelmente positivas, utilizando os testes bioquímicos convencionais (cujos resultados podem estar disponíveis apenas 4 a 5 dias depois) ou testes imunológicos (Su e Liu, 2007).

## **Reacção em cadeia da polimerase (“PCR”)**

De acordo com o ISSC, as ostras prontas a consumir não devem conter mais de 3 UFC de *V. vulnificus* por grama de ostra (Panicker *et al.*, 2004) e de acordo com os limites estabelecidos em 1996 pela International Commission on Microbiological Specifications for Foods (ICMSF), os moluscos bivalves vivos não devem apresentar mais de 100 UFC de *V. parahaemolyticus* por grama (ESR, 2003). Afim de atingir estes objectivos e aumentar a segurança alimentar é importante desenvolver um método de detecção rápido, fiável e sensível. De modo a ultrapassar as desvantagens da identificação por testes morosos (bioquímicos ou imunológicos) na detecção de *V. parahaemolyticus* e *V. vulnificus* vários autores procuraram tirar partido das vantagens dos métodos moleculares.

A substituição dos testes bioquímicos pela identificação com a técnica de “PCR” reduz substancialmente o tempo e trabalho necessário para analisar as amostras. A detecção de patogenicos por “PCR” demonstrou ser específica e mais rápida que os métodos convencionais (Panicker *et al.*, 2004).

Nos últimos anos foi feito um grande esforço para desenvolver métodos moleculares para detecção de bactérias patogénicas do género *Vibrio*. Kim e co-autores (1999) estudaram o gene *toxR* (responsável pela regulação de vários genes em *V. parahaemolyticus*) e desenvolveram um protocolo de “PCR” para a sua detecção. Outros autores desenvolveram sondas para detecção dos genes *tdh* e *trh* de *V. parahaemolyticus* (Lee *et al.*, 1992; McCarthy *et al.*, 2000; Numata *et al.*, 2000; Okuda *et al.*, 2000), ou protocolos de “PCR” com a mesma finalidade (Panicker *et al.*, 2004). Foram igualmente desenhados “primers” específicos para amplificar os genes *tdh* e *trh* separadamente (Tada *et al.*, 1992, Lee e Pan, 1993; Suthienkul *et al.*, 1995) ou em simultâneo (Bej *et al.*, 1999). Para detecção de *V. vulnificus* foram também desenhados “primers” específicos (Lee *et al.*, 1997) e

desenvolvidos protocolos de extracção de DNA para posterior “PCR” (Hill *et al.*, 1991) e “nested-PCR” (Lee *et al.*, 1998).

Apesar de vários protocolos de “PCR” terem sido desenvolvidos para a detecção específica de *V. parahaemolyticus* e de *V. vulnificus*, apenas fornecem resultados qualitativos a menos que sejam usados em conjunto com o método do NMP.

Devido aos constantes avanços na tecnologia, foi possível desenvolver protocolos de “real-time PCR” (direccionado para o gene *tlh* - Kaufman *et al.*, 2004; direccionado para o gene *toxR* - Takahashi *et al.*, 2005) para quantificação de *V. parahaemolyticus* total em moluscos bivalves e água do mar ou para *V. vulnificus* (Campbell e Wright, 2003, Panicker *et al.*, 2004).

Estes protocolos de “PCR” permitem detectar espécies microbianas patogénicas por amplificação de genes específicos. Inclusivamente, permitem detectar organismos que se encontram no estado viável e não cultivável. No entanto, um dos problemas inerentes ao “PCR” tradicional é a sua incapacidade de distinguir células presumivelmente mortas.

## **Materiais e Métodos**

## Ostras

Para este estudo foram analisadas 51 amostras de ostras de duas espécies diferentes: *Crassostrea gigas* e *Crassostrea angulata*. As amostras foram obtidas regularmente em supermercados e peixarias locais. Para cada amostra foram utilizados dois métodos de análise: (1) ensaio de NMP (em Alkaline Peptone Water - APW) seguido de “PCR” (método APW-PCR); e (2) ensaio de NMP (em APW) com isolamento de estirpes em Thiosulfate Citrate Bile Sucrose agar (TCBS) seguido de “PCR” para confirmação das estirpes (método TCBS-PCR). Em ambos os métodos recorreu-se à técnica de “PCR” afim de identificar a presença de *V. vulnificus*, *V. parahaemolyticus* e dos seus factores de virulência (TDH e TRH).

## Estirpes de controlo

Todas as estirpes de controlo utilizadas foram gentilmente cedidas pelo Laboratório Central de Referência para as Contaminações Microbiológicas dos Moluscos Bivalves – Center for Environment, Fisheries and Aquaculture Science (CEFAS), Weymouth, Reino Unido

### TCBS

Afim de facilitar a identificação visual das bactérias alvo, as estirpes Vv18 (*V. vulnificus*) e Vp18 (*V. parahaemolyticus*) foram regularmente semeadas em placas de TCBS.

### PCR

Afim de controlar a reacção em cadeia da polimerase foram utilizadas as estirpes Vv18 (*vvhA*<sup>+</sup>), Vp18 (*toxR*<sup>+</sup>), 27 (*trh*<sup>+</sup>) e V05/63 (*tdh*<sup>+</sup>) e 39 (*tdh*<sup>+</sup>, *trh*<sup>+</sup>).

## **Preparação e enriquecimento das amostras**

Para a preparação de cada amostra foram abertos todos os animais, pesados, cortados e homogeneizados em stomacher 400 (Seward, Reino Unido). Depois de obter o homogeneizado preparou-se a solução mãe, constituída por 25 g de bivalve e 225 g APW. Esta solução foi novamente homogeneizada em stomacher 400 durante dois minutos e depois submetida à técnica do Número Mais Provável (NMP) com três tubos e três diluições. Depois de inoculados, os tubos foram colocados em estufa a 37°C durante cerca de 18 horas.

### **Método APW-PCR**

Procedeu-se à recolha de um ml de caldo de enriquecimento (em duplicado, após agitação de cada tubo) para microtubo afim de efectuar a extracção de DNA.

#### **Extracção de DNA a partir de caldo de enriquecimento (APW)**

Todos os microtubos contendo um ml de caldo de enriquecimento foram agitados e depois centrifugados durante cinco min a 6000 rpm. Depois de descartar o sobrenadante foi-lhes adicionado um ml de Buffered Peptone Water (BPW) (Anexo) e foram novamente agitados. Procedeu-se a nova centrifugação durante cinco min a 6000 rpm. Descartou-se o sobrenadante e adicionou-se 50 µl de água ultra-pura (Qbiogene, EUA). Agitaram-se e foram colocados em banho de água a 100°C durante 15 min após os quais foram centrifugados a 4°C, 10 000 rpm, 10 min. O DNA obtido foi guardado a 4°C até ser testado e posteriormente, a -20°C.

### **Método TCBS-PCR**

#### **Isolamento das colónias**

Após incubação, procedeu-se à repicagem de cada um dos tubos (com ansa de 10 µl, por esgotamento, a partir do cm superficial, sem agitação dos tubos)

para duas placas de TCBS (Scharlau, Espanha). Esta etapa foi realizada em simultâneo com a recolha de meio de enriquecimento para o método anterior. As placas foram depois colocadas a incubar em estufa a 37°C durante 18 - 24 horas.

### **Extracção de DNA de colónias provenientes de TCBS**

Das placas de TCBS já incubadas foram escolhidas, sempre que possível, um mínimo de três colónias (tal como recomendado pela FDA, 2004) características correspondentes a cada tubo e isoladas em Tryptone Soya Agar (TSA) (Oxoid, Inglaterra) com 2% flor de sal. Após incubação destas placas a 37°C durante 18 - 24 horas procedeu-se à extracção de DNA de cada uma das estirpes. Colocou-se uma ansa de um µl de cultura em um ml de BPW, agitou-se e centrifugou-se durante cinco min a 6000 rpm. Depois de descartar o sobrenadante adicionou-se mais um mL de BPW e agitou-se novamente. Procedeu-se a nova centrifugação durante cinco min a 6000 rpm. Descartou-se o sobrenadante e adicionou-se 50 µl de água ultra-pura (Qbiogene, EUA). Agitou-se e colocou-se em banho de água a 100°C durante 15 min após os quais se centrifugou a 4°C, 10 000 rpm, 10 min. O DNA extraído desta forma foi guardado a 4°C até ser testado e posteriormente, a -20°C.

### **Reacção em cadeia da polimerase – “PCR”**

#### **“Primers”**

A presença de *V. vulnificus*, *V. parahaemolyticus* e dos seus factores de virulência foi testada usando a técnica de “PCR” e “primers” já descritos por outros autores. A sequência dos “primers” é a apresentada na tabela 1:



Tabela 1 – Sequências dos “primers” e respectivas fontes

Gene	“Primer”	Sequência	pb	Fonte
<i>vvhA</i>	Vv-1	5′ - gac tat cgc atc aac aac cg - 3′	704	Lee <i>et al.</i> 1997
	Vv-2R	5′ - agg tag cga gta tta ctg cc - 3′		
<i>tdh</i>	Tdh D	5′ - gta aag gtc tct gac ttt tgg ac - 3′	269	Bej <i>et al.</i> 1999
	Tdh R	5′ - tgg aat aga acc ttc atc ttc acc - 3′		
<i>trh</i>	Trh D	5′ - ttg gct tcg ata ttt tca gta tct - 3′	500	
	Trh R	5′ - cat aac aaa cat atg ccc att tcc g - 3′		
<i>toxR</i>	Kim D	5′ - gtc ttc tga cgc aat cgt tg - 3′	368	Kim <i>et al.</i> 1999
	Kim R	5′ - ata cga gtg gtt gct gtc atg - 3′		

### Amplificação por “PCR” dos vários genes em estudo

As amplificações de DNA foram realizadas a partir de diluições decimais do DNA extraído de cada amostra. Cada mistura de reacção (50 µl total) para detecção de *V. vulnificus* e *V. parahaemolyticus* incluiu: 0,25 mM de cada dNTP's (GE Healthcare, Inglaterra), 10 mM de Tris-HCl pH 9,0, 50 mM de KCl, 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM de cada um dos primers (Biomers, Ulm, Alemanha), 0,5 U de *illustra*<sup>TM</sup> Taq DNA polimerase (GE Healthcare, Inglaterra), 2 µl de DNA extraído (diluído 1:10) e 35,5 µl água ultra-pura (Qbiogene, EUA).

A pesquisa dos factores de patogénese de *V. parahaemolyticus* (genes *tdh* e *trh*) foi feita em “multiplex”. Cada mistura de reacção (50 µl total) para a sua detecção incluiu: 0,25 mM de cada dNTP's (GE Healthcare, Inglaterra), 10 mM de Tris-HCl pH 9,0, 50 mM de KCl, 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM de cada um dos primers (Biomers, Ulm, Alemanha) para o gene *tdh*, 0,2 mM de cada um dos primers (Biomers, Ulm, Alemanha) para o gene *trh*, 0,5 U de *illustra*<sup>TM</sup> Taq DNA polimerase (GE Healthcare, Inglaterra), 2µl de DNA extraído (diluído 1:10) e 33,5 µl água ultra-pura (Qbiogene, EUA).

Durante a preparação das misturas de reacção todos os reagentes foram mantidos em gelo. Para cada reacção foram utilizados controlos positivos e negativos. Para cada reacção foi ainda preparado um tubo adicional com todos os reagentes, excepto DNA, o qual foi substituído por igual quantidade de água ultra-pura (Qbiogene, EUA). Este tubo adicional foi denominado branco e serviu como

controlo de possíveis contaminações durante o “PCR”. Foram ainda, sistematicamente, utilizadas pontas de micropipetas com filtro, trabalhou-se em câmaras de fluxo laminar e câmaras de “PCR” e a manipulação das amostras, preparação das misturas de reacção e processamento dos produtos de “PCR” foram realizadas em espaços físicos separados.

As condições de reacção utilizadas são as descritas na tabela 2:

Tabela 2 – Condições de “PCR” utilizadas.

<i>V. vulnificus</i> ( <i>vvhA</i> )	<i>V. parahaemolyticus</i> ( <i>toxR</i> )	genes <i>tdh</i> e <i>trh</i>
94°C 5 min	96°C 5 min	94°C 3 min
94°C 30 s 60°C 30 s 72°C 1 min } 35 x	94°C 1 min 63°C 1,5 min 72°C 1,5 min } 20 x	94°C 1 min 58°C 1 min 72°C 1 min } 30 x
72°C 7 min	72°C 7 min	72°C 5 min

### Visualização dos produtos de amplificação

As amplificações por “PCR” foram realizadas num termociclador da BioRad (i-Cycler, EUA).

Os produtos de amplificação por “PCR” (10 µl) foram misturados com tampão de aplicação 3X (Anexo), separados por electroforese em gel de agarose a 2 % com  $2 \times 10^{-4}$  µg/ml brometo de etídeo (GE Healthcare, Inglaterra), em TBE 0,5X (Anexo), usando uma voltagem de 5 V/cm durante 45 min, visualizados sob luz ultravioleta (UV) num transiluminador GelDoc 2000 UV (BioRad, Hercules, EUA) e fotografados em formato digital. O tamanho dos produtos de “PCR” foi estimado por comparação com a migração do marcador de tamanho de DNA 50 “Base-Pair Ladder” #27400501 (GE Healthcare, Inglaterra).

## **Determinação do NMP e tratamento de resultados**

Os tubos que apresentaram resultado positivo a partir de qualquer um dos métodos foram utilizados para determinar o teor de bactérias presente na amostra usando uma tabela do NMP de três tubos e três diluições (FDA, 2004). Os resultados foram expressos em termos de NMP/g ostra. Foi realizada a transformação logarítmica dos mesmos e, nos casos em que os teores foram inferiores ao limite de detecção, assumiu-se o valor de uma unidade para facilitar a representação gráfica.

## **Resultados e Discussão**

## Detecção de *V. vulnificus*

Neste estudo procurou-se detectar a presença de *V. vulnificus* em amostras ambientais. Para tal recorreu-se à amplificação por “PCR” de um fragmento de 704 pb do seu genoma contendo a sequência que codifica o gene *vvhA*.

Na figura seguinte apresenta-se um gel de agarose da amplificação do gene *vvhA*, por “PCR”.

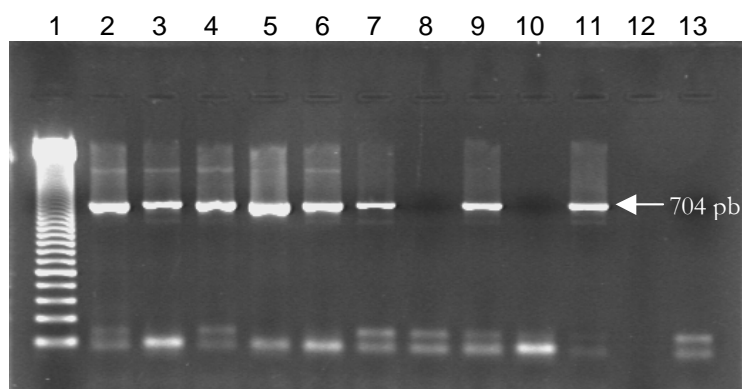


Figura 1 - Gel de agarose dos produtos de “PCR” para detecção de *V. vulnificus* na amostra 1 (2006-11-16 10hr 40min.1sc Ostra B1 Vv). Identificação das pistas: 1- marcador 50 pb; 2- APW tubo 1; 3- APW tubo 2; 4- APW tubo 3; 5- APW tubo 4; 6- APW tubo 5; 7- APW tubo 6; 8- APW tubo 7; 9- APW tubo 8; 10- APW tubo 9; 11- controlo positivo (Vv18 – *vvhA*<sup>+</sup>); 12- branco; 13- controlo negativo (Vp18 – *vvhA*<sup>-</sup>)

A análise dos produtos resultantes destas amplificações permitiu detectar a presença de *V. vulnificus* em quatro das 51 amostras, pelo método APW-PCR e em três das 51 amostras, pelo método TCBS-PCR.

## Detecção de *V. parahaemolyticus*

Também para a detecção de *V. parahaemolyticus* se procedeu à análise dos produtos de amplificação por “PCR”. Neste caso, procurou-se detectar a presença de *V. parahaemolyticus* total por amplificação de um fragmento de 368 pb correspondente ao gene *toxR*.

Na figura seguinte apresenta-se um gel de agarose da amplificação do gene *toxR*, por “PCR”.

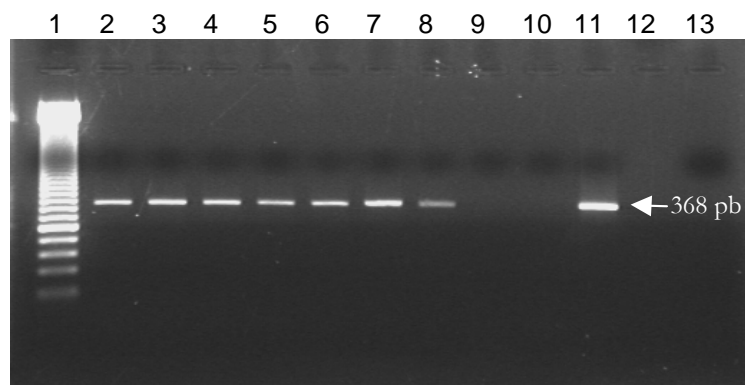


Figura 2 - Gel de agarose dos produtos de “PCR” para detecção do gene *toxR* de *V. parahaemolyticus* (2006-11-16 10hr 40min.1sc Ostra B1 *toxR*). Identificação das pistas: 1- marcador 50 pb; 2- APW tubo 1; 3- APW tubo 2; 4- APW tubo 3; 5- APW tubo 4; 6- APW tubo 5; 7- APW tubo 6; 8- APW tubo 7; 9- APW tubo 8; 10- APW tubo 9; 11- controlo positivo (Vp18 – *toxR*<sup>+</sup>); 12- branco; 13- controlo negativo (Vv18 – *toxR*)

A análise dos produtos resultantes destas amplificações permitiu detectar a presença de *V. parahaemolyticus* em 14 das 51 amostras, pelo método APW-PCR e em 13 das 51 amostras, pelo método TCBS-PCR.

Para a detecção dos factores de virulência de *V. parahaemolyticus* procedeu-se à amplificação de um fragmento, com 269 pb, do seu genoma contendo a sequência que codifica o gene *tdh* e de um fragmento, com 500 pb, contendo a sequência que codifica o gene *trh*.

Na figura 3 apresenta-se um gel de agarose da amplificação dos genes *tdh*, e *trh* por “multiplex PCR”.

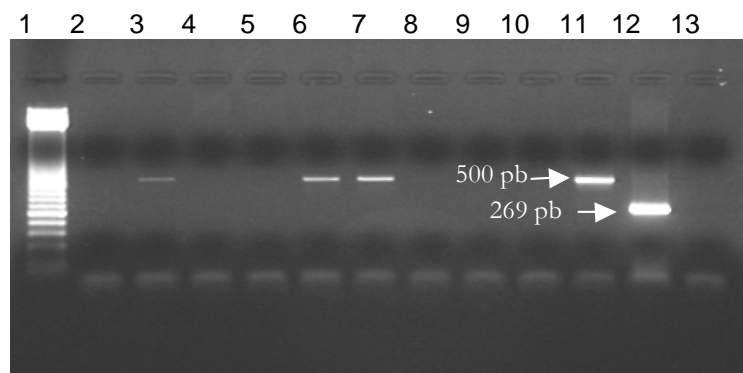


Figura 3 - Gel de agarose dos produtos de “PCR” (multiplex) para detecção dos genes *tdh* e *trh* de *V. parahaemolyticus* (2007-06-12 09hr 59min.1sc ostra B42 e B43 estirpes TDH/TRH) Identificação das pistas: 1- marcador 50 pb; 2- APW amostra 42, tubo 2; 3- APW amostra 42, tubo 3; 4- TCBS amostra 42, estirpe 3; 5- TCBS amostra 42, estirpe 4; 6- TCBS amostra 42, estirpe 5; 7- TCBS amostra 42, estirpe 6; 8- APW amostra 43, tubo 1; 9- TCBS amostra 43, estirpe 2; 10- TCBS amostra 43, estirpe 3; 11- estirpe de controlo 27 (*trh*<sup>+</sup>, *tdh*<sup>-</sup>); 12- estirpe de controlo V05/63 (*trh*<sup>-</sup>, *tdh*<sup>+</sup>); 13- branco

A análise dos produtos resultantes destas amplificações permitiu detectar a presença do gene *tdh* de *V. parahaemolyticus* em apenas uma das 51 amostras, pelo método APW-PCR. Não foi possível detectar a sua presença pelo método TCBS-PCR.

Permitiu ainda detectar a presença do gene *trh* de *V. parahaemolyticus* em cinco das 51 amostras, pelo método APW-PCR e em cinco das 51 amostras, pelo método TCBS-PCR, no entanto, nem sempre o gene foi detectado na mesma amostra pelos dois métodos.

## Teores e sazonalidade dos *Vibrio* halófilos

Os valores de NMP/g ostra obtidos por leitura, na tabela de NMP (FDA, 2004), da combinação de tubos positivos devidamente confirmados por “PCR”, apresentam-se em anexo.

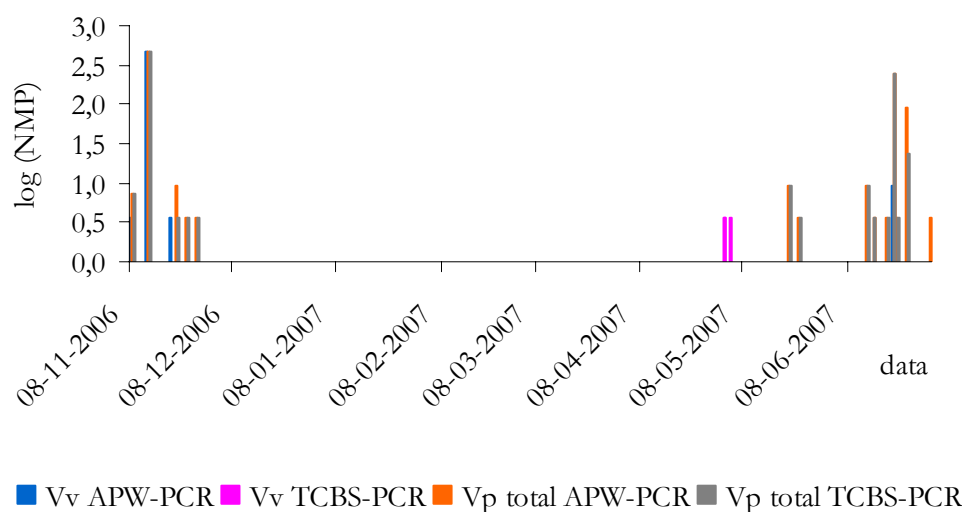


Figura 4 – Representação gráfica dos teores de *V. parahaemolyticus* e *V. vulnificus* detectados pelos método APW-PCR e TCBS-PCR.

Tal como observado em trabalhos anteriores (Strom e Paranjpye, 2000; Wong *et al.*, 2004; Robert-Pillot *et al.*, 2004; Su e Liu, 2007), também neste trabalho se observa a sazonalidade do *V. parahaemolyticus* e *V. vulnificus*. Desde o final de Novembro de 2006 a Abril de 2007 não foi possível detectar as bactérias nas amostras analisadas provavelmente devido à temperatura da água se encontrou mais baixa (IH, 2007).

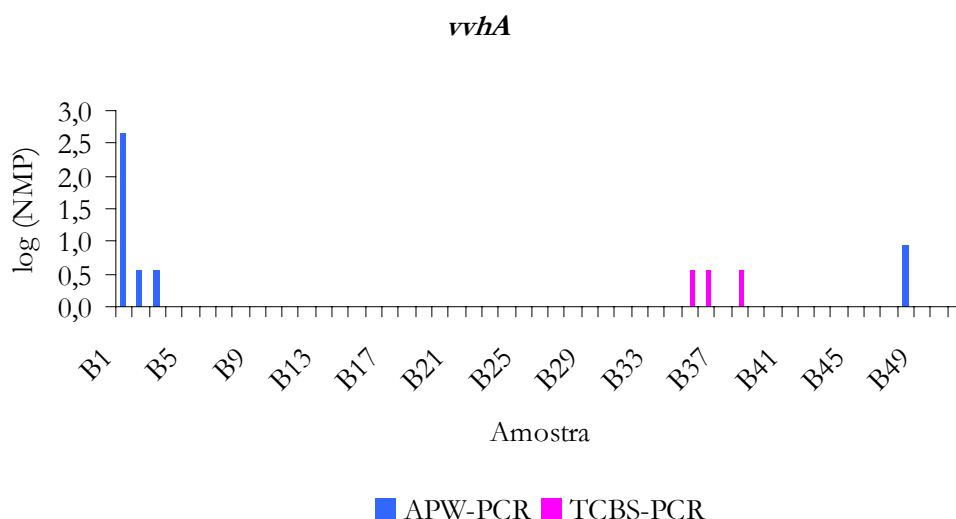


Figura 5 – Representação gráfica dos teores de *V. vulnificus* (log (NMP)/g ostra) determinados por detecção do gene *vvhA*.



De acordo com a representação gráfica acima apresentada, em quatro das 51 amostras de ostra, apenas foi possível detectar o gene *vvhA* pelo método APW-PCR e em três outras amostras apenas foi possível detectar o gene *vvhA* pelo método TCBS-PCR.

É possível que o isolamento das estirpes de *V. vulnificus* presentes nas amostras consideradas positivas pelo método APW-PCR tenha sido dificultado pela aparência idêntica à das colónias de *V. parahaemolyticus*, ou que o seu aspecto tenha sido mascarado por outras bactérias passíveis de crescer em TCBS (como *Pseudomonas*, *Aeromonas*, *Proteus* e *Enterobacteriaceae*). Pode também ter ocorrido a detecção, pelo método APW-PCR, de bactérias mortas ou num estado viável mas não cultivável que, por este motivo, não tiveram capacidade de crescer em TCBS.

Quanto às amostras em que foi possível o isolamento e confirmação das estirpes pelo método TCBS-PCR e não pelo método APW-PCR, existem alguns factores que, talvez possam explicar o sucedido.

No meio de enriquecimento a partir do qual é feita a extracção de DNA (método APW-PCR) encontra-se presente DNA proveniente de várias fontes: das ostras em análise, de outros contaminantes microbiológicos e, possivelmente, da bactéria alvo. É possível que o DNA pretendido se encontre em quantidade diminuta quando comparado com os restantes e não tenha sido detectado. No método TCBS-PCR, o DNA é puro, pois corresponde apenas a uma estirpe, e encontra-se disponível em maior quantidade.

Podem também ter ocorrido ligações inespecíficas do “primer” com outro DNA que não o desejado, limitando a quantidade disponível para ligação ao DNA alvo.

Além destas hipóteses, pode ainda ter ocorrido inibição durante o “PCR”, devido à presença de uma maior concentração de NaCl, proveniente da extracção a partir de APW.

Existe ainda um outro factor que, talvez possa explicar o sucedido. Uma vez que a inoculação das placas de TCBS foi feita (com ansa de 10 µl, a partir do cm superficial dos tubos, sem os agitar) antes de retirar o volume necessário para

proceder à extracção de DNA (após agitar os tubos, afim de conseguir a sua homogeneidade), é possível que a detecção no meio de enriquecimento tenha sido dificultada.

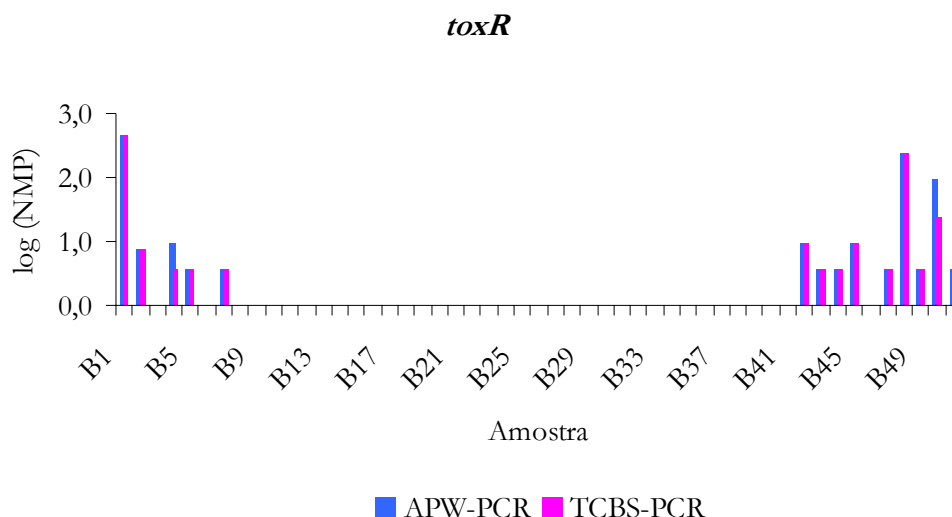


Figura 6 – Representação gráfica dos teores de *V. parahaemolyticus* total (log (NMP)/g ostra) determinados por detecção do gene *toxR*.

De acordo com a representação gráfica acima apresentada, o método APW-PCR detectou o gene *toxR* em 14 das 51 amostras analisadas e o método TCBS-PCR em apenas 13 amostras. O método APW-PCR detectou um teor mais elevado em duas das amostras.

Existem várias explicações possíveis para este facto. A técnica de PCR é muito sensível e por isso permite detectar organismos que se encontrem mortos ou num estado viável mas não cultivável ou ainda, presentes em baixas concentrações (Dileep *et al.*, 2003). É muitas vezes difícil distinguir as colónias de *V. parahaemolyticus* das de *V. vulnificus* ou *V. mimicus* em TCBS, uma vez que estas últimas formam colónias idênticas, tal como verificado por Su e Liu, 2007. As colónias de *V. parahaemolyticus* podem ser difíceis de distinguir visualmente de outras bactérias pois ficam, por vezes, cobertas com uma cor amarela proveniente de bactérias capazes de fermentar a sacarose (Hara-Kudo *et al.*, 2001). Podem também aparecer colónias atípicas de *V. parahemolyticus* que não são escolhidas para caracterização. Pode ainda suceder o aparecimento de

colónias típicas, mas que por algum motivo não são escolhidas para caracterização.

Por todos estes motivos, o método APW-PCR parece ser o mais adequado para detectar a presença de *V. parahaemolyticus* total em ostras.

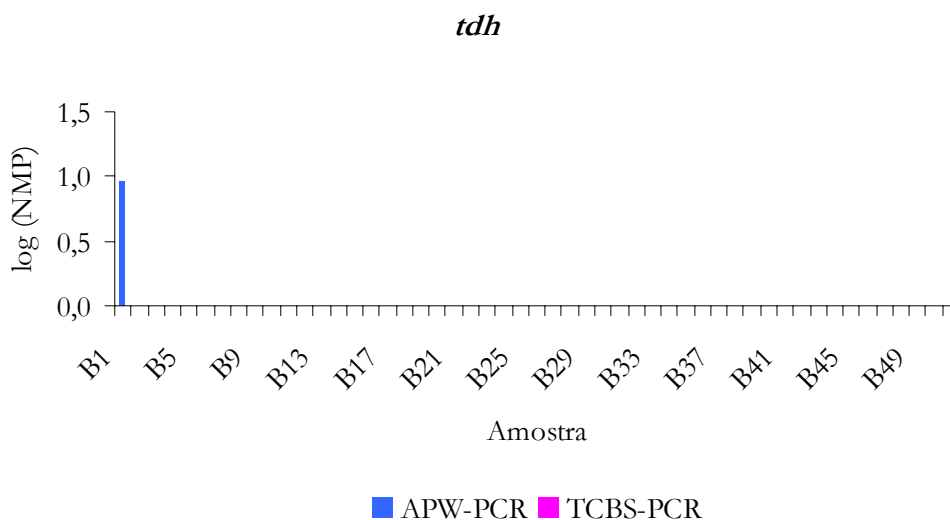


Figura 7 – Representação gráfica dos teores de *V. parahaemolyticus* (log (NMP)/g ostra) potencialmente patogénico, portador do gene *tdh*

De acordo com a representação gráfica acima apresentada, apenas o método APW-PCR detectou o gene *tdh* e em apenas uma amostra. De todas as estirpes isoladas pelo método TCBS-PCR, nenhuma originou uma amplificação positiva do gene *tdh*, apesar de na amostra em questão terem sido isoladas estirpes *toxR* positivas.

Estes resultados parecem indicar que nesta amostra existiam estirpes de *V. parahaemolyticus tdh<sup>-</sup>*, mas também de *V. parahaemolyticus tdh<sup>+</sup>*, e que estas últimas não faziam parte das colónias escolhidas para serem posteriormente testadas com a técnica de “PCR”.

O número de amostras em que foi possível detectar a presença de *V. parahaemolyticus tdh<sup>+</sup>* é baixo. Estes resultados parecem estar de acordo com os obtidos por DePaola *et al.* (2000), Dileep *et al.*, (2003), Robert-Pillot *et al.*, (2004), Deepanjali *et al.*, (2005) e Bauer *et al.*, (2006). De acordo com estes autores, o número de estirpes ambientais portadoras deste gene é muito reduzido (cerca de 1%).

Seria interessante proceder à análise de um maior número de amostras para melhor avaliar a sua presença em ostras.

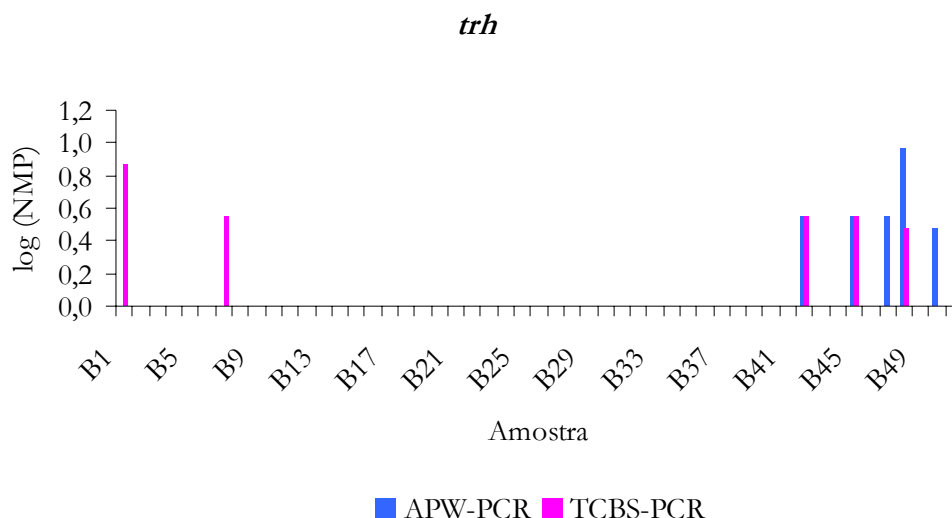


Figura 8 – Representação gráfica dos teores de *V. parahaemolyticus* (log (NMP)/g ostra) potencialmente patogénico, portador do gene *trh*

De acordo com a representação gráfica acima apresentada, o método APW-PCR detectou o gene *trh* em cinco das 51 amostras analisadas, bem como o método TCBS-PCR.

Tal como sucedeu a Dileep *et al.*, 2003, também neste trabalho se verificou a presença, pelo método TCBS-PCR, de estirpes *trh* positivas, sem que as mesmas tenham sido detectadas no respectivo caldo de enriquecimento (método APW-PCR). Foi possível verificar este facto em duas das amostras analisadas. As possíveis explicações para este facto são idênticas às anteriormente apresentadas para a detecção, apenas pelo método TCBS-PCR, do gene *vvhA* de *V. vulnificus*.

Em duas outras amostras, verificou-se o caso contrário, ou seja, foi possível detectar a presença de bactérias portadoras do gene *trh* pelo método APW-PCR, mas estas não foram isoladas. Possivelmente, tal como sucedeu com a amostra portadora de organismos *tdh* positivos, também nestas amostras existiam estirpes de *V. parahaemolyticus trh<sup>-</sup>* e de *V. parahaemolyticus trh<sup>+</sup>*, e estas últimas não foram seleccionadas para posterior isolamento e teste pela técnica de “PCR”.

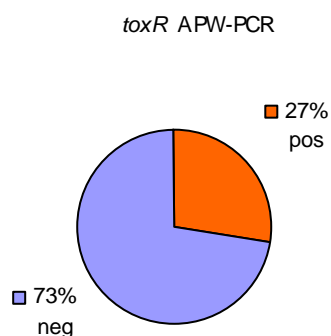


Figura 9 – Detecção de *V. parahaemolyticus* total pelo método APW-PCR

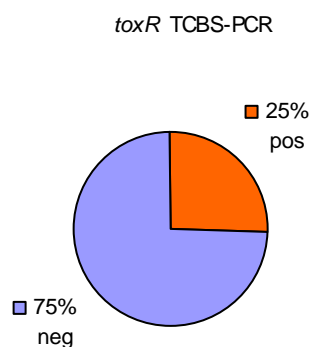


Figura 10 – Detecção de *V. parahaemolyticus* total pelo método TCBS-PCR

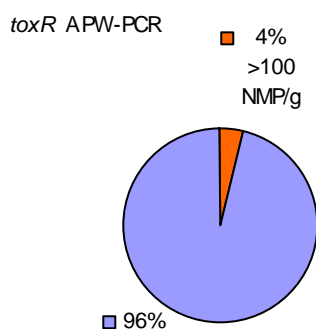


Figura 11 – Detecção de teores superiores a 100 NMP/g de *V. parahaemolyticus* total pelo método APW-PCR

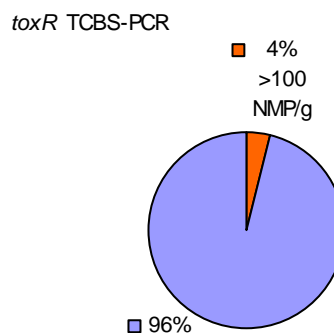


Figura 12 – Detecção de teores superiores a 100 NMP/g de *V. parahaemolyticus* total pelo método TCBS-PCR

Analisando as figuras 9 e 10, acima apresentadas, podemos verificar que o método APW-PCR detectou uma maior percentagem de amostras contendo *V. parahaemolyticus* total quando comparada com a do método TCBS-PCR.

Uma vez que para o *V. vulnificus* o critério geral é a tolerância zero (ausente), não se considerou muito importante comparar detalhadamente os teores detectados por ambos os métodos. Além do mais, os resultados obtidos provinham de amostras diferentes. No entanto, é de referir que para o método APW-PCR, os teores detectados variaram entre 3,6 e 360 NMP/g, enquanto que para o método TCBS-PCR, os teores detectados nunca ultrapassaram os 3,6 NMP/g.

No que diz respeito ao *V. parahaemolyticus*, uma vez que o valor de 100 UFC/g é considerado por várias agências governamentais (ICMSF, 1986; PHLS, 2000, FSANZ, 2001), como o limite aceitável (o ideal seria <3 UFC/g) em moluscos bivalves vivos, próprios para consumo humano, foi também avaliada a capacidade de ambos os métodos detectarem teores superiores a este. Podemos observar, pela análise das figuras 11 e 12 que a percentagem de amostras que apresenta um teor superior a 100 NMP/g foi igual para ambos os métodos. É ainda de acrescentar que o teor máximo detectado foi de 460 NMP/g para os dois métodos.

## Conclusão

Neste trabalho constatou-se a distribuição sazonal das bactérias *V. parahaemolyticus* e *V. vulnificus*, uma vez que apenas foi possível a sua detecção e quantificação no decorrer dos meses em que a temperatura se encontrou mais elevada.

O *V. vulnificus* foi detectado em três e quatro das 51 amostras pelos métodos APW-PCR e TCBS-PCR, respectivamente, em teores que variaram entre 3,6 e 460 NMP/g. O *V. parahaemolyticus* foi detectado em 13 e 14 das 51 amostras pelos métodos APW-PCR e TCBS-PCR, respectivamente, em teores que variaram entre 3,6 e 460 NMP/g. Relativamente aos factores de virulência, a TDH foi detectada numa amostra e apenas pelo método APW-PCR; a TRH foi detectada no mesmo número de amostras (cinco) por ambos os métodos, mas nem sempre na mesma amostra. Assim, dos dois métodos em estudo, o método APW-PCR demonstrou ser o mais adequado para detectar a presença de *V. parahaemolyticus* total em ostras, uma vez que gerou maior número de amostras positivas e detectou teores mais elevados. Este método é especialmente interessante pois reduz bastante o tempo de análise das amostras contribuindo assim para um aumento da segurança alimentar dos consumidores deste tipo de produtos.

Neste trabalho detectaram-se, através do método TCBS-PCR, duas amostras de *V. parahaemolyticus trh* positivas e três amostras positivas para *V. vulnificus*, sem que as mesmas tenham sido detectadas no respectivo caldo de enriquecimento (método APW-PCR). Apesar de tal facto poder dever-se ao procedimento experimental seguido para a toma de amostra (para extracção de DNA pelo método APW-PCR), recomenda-se o recurso a ambos os métodos para a detecção dos factores de virulência do *V. parahaemolyticus* e para a detecção de *V. vulnificus*.

Seria interessante proceder à análise de um maior número de amostras para poder melhor avaliar os dois métodos em estudo, bem como a presença de *V. vulnificus* e dos factores de virulência de *V. parahaemolyticus* em ostras, comercializadas em Portugal. Seria também benéfica a análise de amostras de ostras no decorrer dos meses de Verão, afim de avaliar a capacidade de detecção



e quantificação dos métodos quando os teores destas bactérias e de outros contaminantes são mais elevados.

## **Anexo 1**

### **Tabelas de dados**

Tabela A - Valores de NMP/g ostra obtidos pelo método APW-PCR

	<b>NMP <i>vvhA</i></b>	<b>NMP <i>toxR</i></b>	<b>NMP <i>tdh</i></b>	<b>NMP <i>trh</i></b>
B1	460,0	460,0	9,2	<3,0
B2	3,6	7,4	<3,0	<3,0
B3	3,6	<3,0	<3,0	<3,0
B4	<3,0	9,2	<3,0	<3,0
B5	<3,0	3,6	<3,0	<3,0
B6	<3,0	<3,0	<3,0	<3,0
B7	<3,0	3,6	<3,0	<3,0
B8	<3,0	<3,0	<3,0	<3,0
B9	<3,0	<3,0	<3,0	<3,0
B10	<3,0	<3,0	<3,0	<3,0
B11	<3,0	<3,0	<3,0	<3,0
B12	<3,0	<3,0	<3,0	<3,0
B13	<3,0	<3,0	<3,0	<3,0
B14	<3,0	<3,0	<3,0	<3,0
B15	<3,0	<3,0	<3,0	<3,0
B16	<3,0	<3,0	<3,0	<3,0
B17	<3,0	<3,0	<3,0	<3,0
B18	<3,0	<3,0	<3,0	<3,0
B19	<3,0	<3,0	<3,0	<3,0
B20	<3,0	<3,0	<3,0	<3,0
B21	<3,0	<3,0	<3,0	<3,0
B22	<3,0	<3,0	<3,0	<3,0
B23	<3,0	<3,0	<3,0	<3,0
B24	<3,0	<3,0	<3,0	<3,0
B25	<3,0	<3,0	<3,0	<3,0
B26	<3,0	<3,0	<3,0	<3,0
B27	<3,0	<3,0	<3,0	<3,0
B28	<3,0	<3,0	<3,0	<3,0
B29	<3,0	<3,0	<3,0	<3,0
B30	<3,0	<3,0	<3,0	<3,0
B31	<3,0	<3,0	<3,0	<3,0
B32	<3,0	<3,0	<3,0	<3,0
B33	<3,0	<3,0	<3,0	<3,0
B34	<3,0	<3,0	<3,0	<3,0
B35	<3,0	<3,0	<3,0	<3,0
B36	<3,0	<3,0	<3,0	<3,0
B37	<3,0	<3,0	<3,0	<3,0
B38	<3,0	<3,0	<3,0	<3,0
B39	<3,0	<3,0	<3,0	<3,0
B40	<3,0	<3,0	<3,0	<3,0
B41	<3,0	<3,0	<3,0	<3,0
B42	<3,0	9,2	<3,0	3,6
B43	<3,0	3,6	<3,0	<3,0
B44	<3,0	3,6	<3,0	<3,0
B45	<3,0	9,2	<3,0	3,6
B46	<3,0	<3,0	<3,0	<3,0
B47	<3,0	3,6	<3,0	3,6
B48	9,2	240,0	<3,0	9,2

Tabela A - Valores de NMP/g ostra obtidos pelo método APW-PCR

	<b>NMP <i>vvhA</i></b>	<b>NMP <i>toxR</i></b>	<b>NMP <i>tdh</i></b>	<b>NMP <i>trh</i></b>
B49	<3,0	3,6	<3,0	<3,0
B50	<3,0	93,0	<3,0	3,0
B51	<3,0	3,6	<3,0	<3,0

Tabela B - Valores de NMP/g ostra obtidos pelo método TCBS-PCR

	<b>NMP <i>vvhA</i></b>	<b>NMP <i>toxR</i></b>	<b>NMP <i>tdh</i></b>	<b>NMP <i>trh</i></b>
B1	<3,0	460,0	<3,0	7,4
B2	<3,0	7,4	<3,0	<3,0
B3	<3,0	<3,0	<3,0	<3,0
B4	<3,0	3,6	<3,0	<3,0
B5	<3,0	3,6	<3,0	<3,0
B6	<3,0	<3,0	<3,0	<3,0
B7	<3,0	3,6	<3,0	3,6
B8	<3,0	<3,0	<3,0	<3,0
B9	<3,0	<3,0	<3,0	<3,0
B10	<3,0	<3,0	<3,0	<3,0
B11	<3,0	<3,0	<3,0	<3,0
B12	<3,0	<3,0	<3,0	<3,0
B13	<3,0	<3,0	<3,0	<3,0
B14	<3,0	<3,0	<3,0	<3,0
B15	<3,0	<3,0	<3,0	<3,0
B16	<3,0	<3,0	<3,0	<3,0
B17	<3,0	<3,0	<3,0	<3,0
B18	<3,0	<3,0	<3,0	<3,0
B19	<3,0	<3,0	<3,0	<3,0
B20	<3,0	<3,0	<3,0	<3,0
B21	<3,0	<3,0	<3,0	<3,0
B22	<3,0	<3,0	<3,0	<3,0
B23	<3,0	<3,0	<3,0	<3,0
B24	<3,0	<3,0	<3,0	<3,0
B25	<3,0	<3,0	<3,0	<3,0
B26	<3,0	<3,0	<3,0	<3,0
B27	<3,0	<3,0	<3,0	<3,0
B28	<3,0	<3,0	<3,0	<3,0
B29	<3,0	<3,0	<3,0	<3,0
B30	<3,0	<3,0	<3,0	<3,0
B31	<3,0	<3,0	<3,0	<3,0
B32	<3,0	<3,0	<3,0	<3,0
B33	<3,0	<3,0	<3,0	<3,0
B34	<3,0	<3,0	<3,0	<3,0
B35	3,6	<3,0	<3,0	<3,0
B36	3,6	<3,0	<3,0	<3,0
B37	<3,0	<3,0	<3,0	<3,0
B38	3,6	<3,0	<3,0	<3,0
B39	<3,0	<3,0	<3,0	<3,0
B40	<3,0	<3,0	<3,0	<3,0
B41	<3,0	<3,0	<3,0	<3,0
B42	<3,0	9,2	<3,0	3,6
B43	<3,0	3,6	<3,0	<3,0
B44	<3,0	3,6	<3,0	<3,0
B45	<3,0	9,2	<3,0	3,6
B46	<3,0	<3,0	<3,0	<3,0
B47	<3,0	3,6	<3,0	<3,0
B48	<3,0	240,0	<3,0	3,0

Tabela B - Valores de NMP/g ostra obtidos pelo método TCBS-PCR

	<b>NMP <i>vvhA</i></b>	<b>NMP <i>toxR</i></b>	<b>NMP <i>tdh</i></b>	<b>NMP <i>trh</i></b>
B49	<3,0	3,6	<3,0	<3,0
B50	<3,0	23,0	<3,0	<3,0
B51	<3,0	<3,0	<3,0	<3,0

## **Anexo 2**

**Meios de cultura e reagentes preparados por componentes**

### **APW (Alkaline Peptone Water)**

Peptona bacteriológica	10 g
NaCl	10 g
H <sub>2</sub> O	1000 ml
pH 8,5	

### **BPW (Buffered Peptone Water)**

Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .12	4,5 g
KH <sub>2</sub> PO	0,4 g
NaCl	7,2 g
H <sub>2</sub> O	1000 ml

### **Tampão de aplicação 6 x**

Azul de bromofenol	0,025 g
Xileno cianole	0,025 g
Glicerol	3 ml
H <sub>2</sub> O	7 ml
posteriormente diluir para 3 x	

### **TBE 5 x (Tris-Borate-EDTA)**

Tris base	54 g
Ácido bórico	27,5 g
EDTA	3,77 g
H <sub>2</sub> O	1000 ml
pH 8,3	
posteriormente diluir para 0,5 x	



## **Bibliografia**

**Arias, C.R.**, Macián, M.C., Aznar, R., Garay, E., Pujalte, M.J., "Low incidence of *Vibrio vulnificus* among *Vibrio* isolates from seawater and shellfish of the western Mediterranean coast", Journal of Applied Microbiology, 86 (1999) 125-134

**Barbieri, E.**, Falzano, L., Fiorentini, C., Pianetti, A., Baffone, W., Fabbri, A., Matarrese, P., Casiere, A., Katouli, M., Kühn, I., Möllby, R., Bruscolini, F., Donelli, G., "Occurrence, diversity, and pathogenicity of halophilic *Vibrio* spp. and non-O1 *Vibrio cholerae* from estuarine waters along the Italian Adriatic coast", Applied and Environmental Microbiology, 65 (1999) 2748-2753

**Bauer, A.**, Østensvik, Ø., Florvåg, M., Ørmen, Ø., Rørvik, L.M., "Occurrence of *Vibrio parahaemolyticus*, *V. cholerae*, and *V. vulnificus* in Norwegian blue mussels (*Mytilus edulis*)", Applied and Environmental Microbiology, 72 (2006) 3058-3061

**Bej, A.K.**, Patterson, D.P., Brasher, C.W., Vickery, M.C.L., Jones, D.D., Kaysner, C.A., "Detection of total and hemolysin-producing *Vibrio parahaemolyticus* in shellfish using multiplex PCR amplification of *tl*, *tdh* and *trh*", Journal of Microbiological Methods, 36 (1999) 215-225

**Blake, P.A.**, Weaver, R.E., Hollis, D.G., "Diseases of humans (other than cholera) caused by *Vibrios*", Annual Reviews on Microbiology, 34 (1980) 341-367

**Calero, A.G.**, "Application of molecular detection methods to most probable number (MPN) enumeration of *Vibrio vulnificus* in oysters", Tese de mestrado Universidade da Flórida, 2003

**Campbell, M.S., Wright, A.C.**, "Real-time PCR analysis of *Vibrio vulnificus* from oysters", Applied and Environmental Microbiology, 69 (2003) 7137-7144

Center for Food Safety and Applied Nutrition (**CFSAN**), "Draft risk assessment on the public health impact of *Vibrio parahaemolyticus* in raw molluscan shellfish ", Food and Drug Administration (FDA), (2000), Informação online: <http://www.cfsan.fda.gov/~dms/vprisk.html>, consultada em Agosto 2007

Center for Food Safety and Applied Nutrition (**CFSAN**), FDA, "Foodborne Pathogenic Microorganisms and Natural Toxins Handbook - *Vibrio parahaemolyticus*", 2006, Informação online: (<http://www.cfsan.fda.gov/~mow/chap9.html>), consultada em Agosto 2007

**Comissão europeia**, "Opinion of the scientific committee on veterinary measures relating to public health on *Vibrio vulnificus* and *Vibrio parahaemolyticus* (in raw and undercooked seafood)", 2001

**Comissão europeia**, "Recomendação da comissão de 10 de Janeiro de 2003 relativa a um programa coordenado de controlo oficial dos géneros alimentícios para 2003", Jornal Oficial das Comunidades Europeias, L7/76, 2003

**Costa, A. P.**, “Convidados indesejáveis”, Selecções do Reader’s Digest. Informação online: <http://www.seleccoes.pt/Revista/detalhe.asp?ID=5835>, consultada em Agosto de **2007**

**Deepanjali, A.**, Kumar, H.S., Karunasagar, I., Karunasagar, I., “Seasonal variation in abundance of total and pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* bacteria in oysters along the southwest coast of India”, Applied and Environmental Microbiology, 71 (**2005**) 3575-3580

**DePaola, A.**, Capers, G.M., Alexander, D., “Densities of *Vibrio vulnificus* in the intestines of fish from the U.S. Gulf coast”, Applied and Environmental Microbiology, 60 (**1994**) 984-988

**DePaola, A.**, Kaysner, C.A., Bowers, J., Cook, D.W., “Environmental Investigations of *Vibrio parahaemolyticus* in oysters after outbreaks in Washington, Texas and New York (1997 and 1998)”, Applied and Environmental Microbiology, 66 (**2000**) 4649-4654

**Dileep, V.**, Kumar, H.S., Nishibuchi, M., Karunasagar, I., Karunasagar, I., “Application of polymerase chain reaction for detection of *Vibrio parahaemolyticus* associated with tropical seafoods and coastal environment”, Letters in Applied Microbiology, 36 (**2003**) 423-427

**Euzéby, J.P.**, “List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature: a folder available on the Internet”, International Journal of Systematic Bacteriology, 47 (1997), 590-592. Last full update August 09, **2007**. <http://www.bacterio.net>

**Fischer Le-Saux, M.**, Hervio-Heath, D., Loaec, S., Colwell, R.R., Pommepuy, M., “Detection of cytotoxin-hemolysin mRNA in nonculturable populations of environmental and clinical *Vibrio vulnificus* strains in artificial seawater”, Applied and Environmental Microbiology, 68 (**2002**) 5641-5646

Fisheries and Oceans Canada (**FOC**) – Aquaculture, “Oysters – ‘myths’ and facts.” Informação online. [http://www.dfo-mpo.gc.ca/Aquaculture/sheet\\_feuillet/oyster-huitre\\_e.htm](http://www.dfo-mpo.gc.ca/Aquaculture/sheet_feuillet/oyster-huitre_e.htm), (**2007**) consultado em Agosto de 2007

Food and Drug Administration (**FDA**), Bacteriological Analytical Manual, “Appendix 2. Most Probable Number from Serial Dilutions”, Fevereiro **2006**, Informação online: <http://www.cfsan.fda.gov/~ebam/bam-a2.html> consultada em Agosto 2007

Food and Drug Administration (**FDA**), Bacteriological Analytical Manual, “Chapter 9. *Vibrio*”, 8<sup>th</sup> edition, substantially rewritten and revised May **2004**. Informação online: <http://www.cfsan.fda.gov/~ebam/bam-9.html> consultada em Agosto 2007

Food Standards Australia New Zealand (**FSANZ**), "Guidelines for the microbiological examination of ready-to-eat foods", **2001**, informação online: <http://www.foodstandards.gov.au/newsroom/publications/guidelinesformicrobi1306.cfm> consultada em Agosto 2007

**Hara-Kudo, Y.**, Nishina, T., Nakagawa, H., Konuma, H., Hasegawa, J., Kumagai, S., "Improved method for detection of *Vibrio parahaemolyticus* in seafood", Applied and Environmental Microbiology, 67 (**2001**) 5819-5823

**Hill, W.E.**, Keasler, S.P., Trucksess, M.W., Feng, P., Kaysner, C.A., Lampel, K.A., "Polymerase Chain Reaction identification of *Vibrio vulnificus* in artificially contaminated oysters", Applied and Environmental Microbiology, 57 (**1991**) 707-711

**Hlady, W.G.**, "Vibrio infections associated with raw oyster consumption in Florida, 1981-1994", Journal of Food Protection, 60 (**1997**) 353-357

**Hoi, L.**, Larsen, J.L., Dalsgaard, I. and Dalsgaard, A., "Occurrence of *Vibrio vulnificus* in Danish marine environments", Applied and Environmental Microbiology, 64 (**1998**) 7-13

**Hollis, D.G.**, Weaver, R.E., Baker, C.N., Thornsberry, C., "Halophilic vibrio species isolated from blood cultures", Journal of Clinical Microbiology, 3 (**1976**) 425-431

Institute of Environmental Science & Research Limited (**ESR**), "Risk Profile: *Vibrio parahaemolyticus* in seafood", New Zealand, **2003**, informação online: <http://www.nzfsa.govt.nz/science/risk-profiles/> consultada em Agosto 2007

Instituto Hidrográfico (**HI**), Informação online: <http://www.hidrografico.pt> consultada em Agosto de **2007**

International Commission on Microbiological Specifications for Foods (**ICMSF**), "Microorganisms in foods - 2 - Sampling for microbiological analysis: Principles and specific applications. 2nd ed. Blackwell Scientific Publication, **1986**

Interstate Shellfish Sanitation Conference (**ISSC**), "Consumer information." Informação online. <http://www.issc.org/consumerinfo/oysters.aspx>, (**1998**) consultada em Agosto de 2007

**Janda, J.M.**, Powers, C., Bryant, R.G., Abbott, S.L., "Current perspectives on the epidemiology and pathogenesis of clinically significant *Vibrio* spp", Clinical Microbiology Reviews, 1 (**1988**) 245-267

Joint **FAO/WHO** Expert Consultation on Risk Assessment of Microbiological Hazards in Foods, "Hazard identification, exposure assessment and hazard characterization of *Campylobacter* spp. in broiler chickens and *Vibrio* spp. in seafood", Ad hoc expert consultations on risk assessment of microbiological hazards in foods, WHO Headquarters, Geneva, Switzerland, 23 - 27 July **2001**

**Jørgensen, C.B.**, "Bivalve filter feeding revisited", Marine Ecology Progress Series, 142 (**1996**) 287-302

**Kaufman, G.E.**, Blackstone, G.M., Vickery, M.C., Bej, A.K., Bowers, J., Bowen, M.D., Meyer, R.F., DePaola, A., "Real-time PCR quantification of *Vibrio parahaemolyticus* in oysters using an alternative matrix", Journal of Food Protection, 67 (**2004**) 2424-2429

**Kim, Y.B.**, Okuda, J., Matsumoto, C., Takahashi, N., Hashimoto, S., Nishibushi, M., "Identification of *Vibrio parahaemolyticus* at the species level by PCR targeted to the *ToxR* gene", Journal of Clinical Microbiology, 37 (**1999**) 1173-1177

**Lee, C.Y.**, Chen, L.H., Liu, M.L., Su, Y.C., "Use of an oligonucleotide probe to detect *Vibrio parahaemolyticus* in artificially contaminated oysters", Applied and Environmental Microbiology, 58 (**1992**) 3419-3422

**Lee, C.Y., Pan, S.F.**, "Rapid and specific detection of the thermostable direct hemolysin gene in *Vibrio parahaemolyticus* by the polymerase chain reaction", Journal of General Microbiology, 139 (**1993**) 3225-3231

**Lee, J.Y.**, Eun, J.B., Choi, S.H., "Improving detection of *Vibrio vulnificus* in *Octopus variabilis* by PCR ", Journal of Food Science, 62 (**1997**) 179-182

**Lee, S.E.**, Kim, S.Y., Kim, S.J., Kim, H.S., Shin, J.H., Choi, S.H., Chung, S.S., Rhee, J.H., "Direct identification of *Vibrio vulnificus* in clinical specimens by nested PCR", 36 (**1998**) 2887-2892

**Lin, Z.**, Kumagai, K., Baba, K., Mekalanos, J.J., Nishibushi, M., "*Vibrio parahaemolyticus* has a homolog of the *Vibrio cholerae* *toxRS* operon that mediates environmentally induced regulation of the thermostable direct hemolysin gene", Journal of Bacteriology, 175 (**1993**) 3844-3855

**McCarthy, S.A.**, DePaola, A., Kaysner, C.A., Hill, W.E., Cook, D.W., "Evaluation of nonisotopic DNA hybridization methods for detection of the *tdh* gene of *Vibrio parahaemolyticus*", Journal of Food Protection, 63 (**2000**) 1660-1664

**Montville, T.J.**, Matthews, K.R., *Vibrio* Species in: "Food microbiology: an introduction", ASM Press, Washington (DC), **2005**, pp.147-156

**Nilsson, W.B.**, Paranjpye, R.N., DePaola, A., Strom, M.S., "Sequence polymorphism of the 16S rRNA gene of *Vibrio vulnificus* is a possible indicator of strain virulence", Journal of Clinical Microbiology, 41 (**2003**) 442-446

**Numata, N.**, Ushimizu, M., Ohtomo, M., Chida, K., Fujita, H., Saito, T., Suto, D., Oguro, M., Hayakawa, Y., Sasaki, K., Arakawa, E., Shimada, T., Watanabe, H., "The use of colony hybridization in the isolation of thermostable direct hemolysin-producing *Vibrio parahaemolyticus* from foods implicated in an incidence of food poisoning" Japanese Journal of Infectious Diseases, 53 (2000) 75-77

**Okuda, J.**, Ishibashi, M., Abbott, S.L., Janda, J.M., Nishibushi, M., "Analysis of the thermostable direct hemolysin (*tdh*) gene and the *tdh*-related hemolysin (*trh*) genes in urease-positive strains of *Vibrio parahaemolyticus* isolated on the West Coast of the United States", Journal of Clinical Microbiology, 35 (2000) 1965-1971

**Oliver, J.D.**, Warner, R.A., Cleland, D.R., "Distribution of *Vibrio vulnificus* and other lactose-fermenting vibrios in the marine environment", Applied and Environmental Microbiology, 45 (1983) 985-998

**Panicker, G.**, Call, D.R., Krug, M.J., Bel, A.K., "Detection of pathogenic *Vibrio* spp. In shellfish by using multiplex PCR and DNA microarrays", Applied and Environmental Microbiology, 70 (2004) 7436-7444

**Panicker, G.**, Myers, M.L., Bej, A.K., "Rapid detection of *Vibrio vulnificus* in shellfish and gulf of Mexico water by Real-Time PCR", Applied and Environmental Microbiology, 70 (2004) 498-507

**Pedro, S.**, Castro, S., Santos, M., Santos, A.T., "Characterization of *Vibrio parahaemolyticus* isolated from seafood products", Proceedings of the 35th WEFTA meeting, Antuérpia, Bélgica, (2005) 371-380

**PHLS** advisory committee for food and dairy products, "Guidelines for the microbiological quality of some ready-to-eat foods sampled at the point of sale", Communicable Disease and Public Health, 3 (2000) 163-167

**Ripabelli, G.**, Sammarco, M. L., Grasso, G.M., Fanelli, I., Caprioloi, A. and Luzzi, I., "Occurrence of *Vibrio* and other pathogenic bacteria in *Mytillus galloprovincialis* (mussels) harvested from Adriatic Sea, Italy", International Journal of Food Microbiology, 49 (1999) 43-48

**Robert-Pillot, A.**, Guénolé, A., Lesne, J., Delesmont, R., Fournier, J.-M., Quilici, M.-L., "Occurrence of the *tdh* and *trh* genes in *Vibrio parahaemolyticus* isolates from waters and raw shellfish collected in two French coastal areas and from seafood imported into France", International Journal of Food Microbiology, 91 (2004) 319-325

**Strom, M.S., Paranjpye, R.N.**, "Epidemiology and pathogenesis of *Vibrio vulnificus*", Microbes and Infection, 2 (2000) 177-188

**Su, Y. C., Liu, C.**, "*Vibrio parahaemolyticus*: a concern of seafood safety", Food Microbiology, 24 (2007) 549-558

**Suthienkul, O.**, Ishibashi, M., Iida, T., Netti, N., Supavej, S., Eampokalap, B., Makino, M., Honda, T., "Urease production correlates with possession of the *trh* gene in *Vibrio parahaemolyticus* strains isolated in Thailand", Journal of Infectious Diseases, 172 (1995) 1405-1408

**Tada, J.**, Ohashi, T., Nishimura, N., Shirasaki, Y., Ozaki, H., Fikushima, S., Takano, J., Nishibushi, M., Takeda, Y., "Detection of the thermostable direct hemolysin gene (*tdh*) and the thermostable direct hemolysin-related hemolysin gene (*trh*) of *Vibrio parahaemolyticus* by polymerase chain reaction", Molecular Cellular Probes, 6 (1992) 477-487

**Takahashi, H.**, Iwade, Y., Konuma, H., Hara-Kudo, Y., "Development of a quantitative real-time PCR method for estimation of the total number of *Vibrio parahaemolyticus* in contaminated shellfish and sea water", Journal of Food Protection, 68 (2005) 1083-1088

**Tamplin, M.L., Capers, G.M.**, "Persistence of *Vibrio vulnificus* in tissues of Gulf Coast oysters, *Crassostrea virginica*, exposed to seawater disinfected with UV light", Applied and Environmental Microbiology, 58 (1992) 1506-1510

**Thompson, F.L.**, Iida, T., Swings, J., "Biodiversity of *Vibrios*", Microbiology and Molecular Biology Reviews, 68 (2004) 403-431

**Tyson, D.L., Kelly, M.T.**, "Virulence of *Vibrio vulnificus* strains from marine environments", Applied and Environmental Microbiology, 51 (1986) 1004-1006

**Wong, H.**, "Detecting and molecular typing of *Vibrio parahaemolyticus*", Journal of Food and Drug Analysis, 11 (2003) 79-86

**Wong, H.C.**, Shen, C.T., Chang, C.N., Lee, Y.S., Oliver, J.D., "Biochemical and virulence characterization of viable but nonculturable cells of *Vibrio parahaemolyticus*", Journal of Food Protection, 67 (2004) 2430-2435

World Health Organization (**WHO**), "Risk assessment of *Vibrio vulnificus* in raw oysters", Microbiological Risk Assessment Series, Chapter 8, 2005

**Wright, A.C.**, Hill, R.T., Johnson, J.A., Roghman, M.C., Colwell, R.R., Morris, J.J.G., "Distribution of *Vibrio vulnificus* in the Chesapeake Bay", Applied and Environmental Microbiology, 62 (1996) 717-724

**Adviware Pty Ltd**, "Statistics by country for *Vibrio parahaemolyticus*", informação online: [www.wrongdiagnosis.com/v/vibrio\\_parahaemolyticus/stats-country.htm#extrapwarning](http://www.wrongdiagnosis.com/v/vibrio_parahaemolyticus/stats-country.htm#extrapwarning) consultada em Agosto 2007